

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 28 March 2001 (28.03.01)	
International application No. PCT/IB00/00918	Applicant's or agent's file reference 02280PC
International filing date (day/month/year) 07 July 2000 (07.07.00)	Priority date (day/month/year) 09 July 1999 (09.07.99)
Applicant MISEREZ, André, R.	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

30 January 2001 (30.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Pascal Piriou Telephone No.: (41-22) 338.83.38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 16 OCT 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 02280PC	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/IB00/00918	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder MISEREZ, André, R.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 30/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 12.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Mueller, F Tel. Nr. +49 89 2399 7722 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-54 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-31 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-6, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 1,11.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1,11 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/IB00/00918

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
 - ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
 - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
 - ☐ erfüllt ist
 - ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - ☒ alle Teile.
 - ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	18,25
	Nein: Ansprüche	1-17,19-24,26-31
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	18,25
	Nein: Ansprüche	1-17,19-24,26-31
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	2-10,12-31 (1,11?)
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Die Ansprüche 1 und 11 haben ein Verfahren zum Gegenstand welches die Blut- bzw. Gewebeentnahme mit einschliesst und haben daher den Anschein eines in vivo Verfahrens. Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 11 fällt somit unter die Verordnung nach Regel 67.1 (iv) PCT und eine Meinung über deren gewerbliche Anwendbarkeit wird nicht gegeben (Artikel 34(4)(a)(i) PCT).

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Anforderung einer einheitlichen Erfindung (Regel 13.1 PCT).

Wie genauer unter Punkt 5 aufgeführt wird ist ein Verfahren zur Erkennung von Krankheiten im Zusammenhang von Polymorphismen im SREBP Gen neu jedoch nicht erfinderisch. Im Stand der Technik wird der Fachmann motiviert nach Mutationen in SREBP Genen zu suchen, die im Zusammenhang mit Veränderungen im Cholesterin- und LDL- Haushalt stehen. Das der vorliegende Anmeldung zu grunde liegende gemeinsame Konzept, nämlich das Auffinden von Mutationen im SREBP Gen, ist somit nicht erfinderisch. Jede Mutation im SREBP Gen beschreibt somit eine eigene Erfindung. Die vorliegende Anmeldung spaltet sich somit in die zu den gefundenen Mutationen komplementären Primer/Sonden Sequenzen auf (Seq Id 3; Seq Id 7, Seq Id 9; Seq Id 10, Seq Id 11, Seq Id 12, Seq Id 13, Seq Id 14, Seq Id 15, Seq Id 16, Seq Id 17, Seq Id 18). Jede Seq ID beschreibt somit eine eigene Erfindung. Zur Beschleunigung des Verfahrens wird die Anmeldung jedoch als ganzes geprüft.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der

erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf folgende Dokumente verwiesen:

- D1: MISEREZ ANDREW G ET AL: GENOMICS, Bd. 40, Nr. 1, 1997, SISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt
- D2: US-A-5 891 631
- D3: MISEREZ: 'UNI NOVA, WISSENSCHAFTMAGAZIN DER UNIVERSITÄT BASEL, Bd. 81, April 1998 (1998-04), XP002159139
- D4: HUA XIANXIN ET AL: GENOMICS, Bd. 25, Nr. 3, 1995, Seiten 667-673, XP000979463
- D5 Yang J. et al., J. Biological Chemistry, 270, 20, 19.05.1995, pp. 12152-12161
- D6: Hacia J.G. et al., Genomic Research, 8, 12, 1998, 1245-1258
- D7: Pai J. et al., J. Biological Chemistry, 273, 40, 02.10.1998, 26138-26148

Die Dokumente D5 und D7 sind nicht im Internationalen Recherchenbericht zitiert. Kopien davon sind als Anlage an diesen Bescheid zu finden (Richtlinien III, 7.24 PCT).

- 1. Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 1 ist neu (Artikel 33 (2) PCT).
Ein Verfahren zur Erkennung eines erhöhten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos in Abhängigkeit des SREBP-Gens ist im Stand der Technik nicht offenbart.
- 1.1 Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 1 ist nicht erfinderisch (Artikel 33 (3) PCT).
D1 wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen. D1 beschreibt die Struktur des menschlichen Gens SREBF2, welches eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Cholesterin Biosynthese und des LDL Stoffwechsels besitzt. Die Möglichkeit von genetischen Variationen in diesem Gen, die zu unterschiedlichen LDL-Niveaus im Plasma führen können wird diskutiert (S. 31, 2. Spalte; S. 32, 1. Spalte 2. Absatz). D1 sagt weiterhin, dass noch über keine "natürlich" vorkommenden Mutationen im SREBF1 und SREBF2 Gen berichtet wurde (S.

32, 1. Spalte, letzter Absatz), bezieht sich jedoch gleichzeitig auf eine Publikation von Yang et al. (D5), die über ein verkürztes SREBP-2 protein in Hamsterzellen (CHO) zu berichten weis, siehe z.B.: Diskussion in D5. Weiterhin diskutiert D5 die wichtige Rolle des SREBP-2 Gens in der Regulierung des Cholesterin Metabolismus. D1 führt in seinem letzten Absatz auf Seite 38, 2. Spalte den Fachmann auf die Spur, dass Variationen des SREBF1 und SREBF2 Gens in Zusammenhang mit Abweichungen im Lipidhaushalt auch im menschlichen Genom zu finden seien könnten (im Hinblick auf LDL und Cholesterin-Haushalt, siehe auch D2, Seite 5, 2. Absatz). Auch in D4, einem weiteren Dokument auf dem Gebiet der SREBF-Gene, wird der Zusammenhang von SREBF2 und SREBF1 mit der Cholesterin-Synthese und dem LDL Metabolismus und mögliche phenotypische Effekte welche durch genetische Variationen hervorgerufen werden können, diskutiert (S. 672, 1. Spalte 2. Absatz ff.). D3 beschreibt die SREBP Proteine und Gene als mögliche Zielmoleküle zur Behandlung von Hypercholestrolemia und damit assoziierten Krankheiten (Spalte 2, Zeile 64 ff.). D7, beschreibt mehrere Varianten der SREBP Gene (SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2), welche den Cholesterin- und Fettsäurehaushalt der Zelle modulieren (siehe Diskussion).

Durch die in D1 geführte Diskussion ist der Fachmann über die wichtige Funktion der SREBF Gene (SREBF1 und SREBF2) informiert und durch die Darlegungen aus D3, D4, D5 und D7 hat der Fachmann Anleitung und grösstmögliche Motivation erfahren nach möglichen Mutationen und Polymorphismen in den SREBF Genen, welche im Zusammenhang mit Krankheiten des Cholesterin- und LDL-Haushaltes stehen, zu suchen.

Die Erfordernisse für eine erfinderische Tätigkeit sind somit nicht erfüllt (Artikel 33 (3) PCT).

- 1.2 Derselben Begründung folgend erfüllen die abhängigen Ansprüche 2-6, 10-13, 15-17, 19 und die Ansprüche 28 und 29 ebenfalls nicht die Erfordernisse von Artikel 33(3) PCT.
- 1.3 Der Gegenstand der Ansprüche 7, 8, 9, 14, und 30, 31 ist neu (Artikel 33 (2) PCT) jedoch nicht erfinderisch (Artikel 33 (3) PCT).
Im Stand der Technik wird auf Nukleotidvariationen in den Genen SREBP-1 und SREBP-2 hingewiesen. Der Fachmann wird daher veranlasst nach Mutationen in

diesen Genen zu suchen. Dem Auffinden von Mutationen in diesen Genen, durch Sonden, Primer oder durch Restriktionsanalyse kann daher keine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

- 1.4 Der Gegenstand des Anspruchs 18 ist neu (Artikel 33 (2) PCT und erfinderisch (Artikel 33 (3) PCT).

Im Stand der Technik ist kein Zusammenhang zwischen SREBP-1 und SREBP-2 , sowie von Polymorphismen dieser Gene, mit davon abzuleitenden Nebenwirkungen bei einer HIV-Therapie offenbart. Eine erfinderische Tätigkeit kann somit anerkannt werden.

2. Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 20, sowohl der abhängigen Ansprüche 21-27 ist neu (Artikel 33 (2) PCT).

Die Verwendung von DNA- oder RNA-Chips ist ein im Stand der Technik übliches Verfahren um Polymorphismen zu erkennen. Als Beispiel beschreibt D6 die Verwendung von High-Density Oligonucleotide Arrays zur Untersuchung von heterozygoten und homozygoten Sequenzvariation im grossen multiexon ATM Gen (S. 1255, 1. Spalte, 2.Absatz). Mit dem im Stand der Technik (D1-D5) zugänglichen Wissen, aufgeführt in Punkt 1.1 dieses Bescheides, ist somit die Verwendung von DNA oder RNA Chips zur Erkennung von Mutationen in den Genen SREBP-1 UND SREBP-2 für den Fachmann offensichtlich. Eine erfinderische Tätigkeit ist somit nicht erforderlich. Die Erfordernisse von Artikel 33 (3) PCT sind somit für den Gegenstand des Anspruchs 20 nicht erfüllt.

- 2.1 Derselben Begründung folgend erfüllt auch der Gegenstand der Ansprüche 21-24 und 26, 27 nicht die Erfordernisse von erfinderischer Tätigkeit (Artikel 33 (3) PCT).
- 2.2 Dem Gegenstand des Anspruchs 25 kann erfinderische Tätigkeit anerkannt werden (siehe Begründung unter Punkt 1.4 in diesem Bescheid).

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Der Inhalt der Zeilen 4-9 auf Seite 1 ist belanglos nach Regel 9.1(iv) PCT.
2. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D3,D5,D6 und D7 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 02280PC	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/IB 00/ 00918	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09/07/1999
Anmelder MISEREZ, André, R.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MISEREZ ANDREW G ET AL: "Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2)." GENOMICS, Bd. 40, Nr. 1, 1997, Seiten 31-40, XP002159138 ISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Februar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MISEREZ: "Die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts"</p> <p>UNI NOVA, WISSENSCHAFTSMAGAZIN DER UNIVERSITÄT BASEL, 'Online!</p> <p>Bd. 81, April 1998 (1998-04), XP002159139</p> <p>Gefunden im Internet: <URL:http://www.zuv.unibas.ch/uni_nova/081/11.shtml> 'gefunden am 2001-01-30!</p> <p>in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
X	<p>US 5 891 631 A (WANG XIAODONG ET AL)</p> <p>6. April 1999 (1999-04-06)</p> <p>Spalte 1-3 Spalte 7-11 Spalte 31-36; Beispiele 3,4</p> <p>---</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
X	<p>HUA XIANXIN ET AL: "Structure of the Human Gene Encoding Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBF1) and Localization of SREBF1 and SREBF2 to Chromosomes 17p11.2 and 22q13."</p> <p>GENOMICS, Bd. 25, Nr. 3, 1995, Seiten 667-673, XP000979463 ISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
A	<p>WANG XIAODONG ET AL: "Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis"</p> <p>THE EMBO JOURNAL, Bd. 15, Nr. 5, 1996, Seiten 1012-1020, XP002159140 Seite 1015; Abbildung 6</p> <p>---</p>	<p>1-31</p>
A	<p>BROWN MS UND GOLDSTEIN JL: "The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor"</p> <p>CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 89, 2. Mai 1997 (1997-05-02), Seiten 331-340, XP002123067 ISSN: 0092-8674 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	<p>1-31</p>

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SHIMANO HITOSHI IICHIRO SHIMOMURA ET AL: "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 100, Nr. 8, 1997, Seiten 2115-2124, XP002931070 ISSN: 0021-9738 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-31
A	<p>HACIA JOSEPH G ET AL: "Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays." GENOME RESEARCH, Bd. 8, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 1245-1258, XP002925459 ISSN: 1088-9051 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 00/00918

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5891631 A	06-04-1999	US 5527690 A	18-06-1996
		US 5498696 A	12-03-1996
		AU 6911194 A	12-12-1994
		EP 0698115 A	28-02-1996
		WO 9426922 A	24-11-1994

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

E. BLUM & Co.
Vorderberg 11
8044 ZÜRICH
SUISSE

15. OKT. 2001				
LPA	NF	MR	VW	RP
2				
15.10.2001				
17.10.2001				

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 12.10.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
02280PC

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/IB00/00918

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
07/07/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
09/07/1999

Anmelder
MISEREZ, André, R.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

MYLONAS, E

Tel. +49 89 2399-7746



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 02280PC	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/IB00/00918	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder MISEREZ, André, R.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 30/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 12.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Mueller, F Tel. Nr. +49 89 2399 7722 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-54 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-31 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-6, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 1, 11.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1, 11 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
 - ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
 - ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
 - ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
 - ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
 - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
 - ☐ erfüllt ist
 - ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - ☒ alle Teile.
 - ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	18,25
	Nein: Ansprüche	1-17,19-24,26-31
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	18,25
	Nein: Ansprüche	1-17,19-24,26-31
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	2-10,12-31 (1,11?)
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Die Ansprüche 1 und 11 haben ein Verfahren zum Gegenstand welches die Blut- bzw. Gewebeentnahme mit einschliesst und haben daher den Anschein eines in vivo Verfahrens. Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 11 fällt somit unter die Verordnung nach Regel 67.1 (iv) PCT und eine Meinung über deren gewerbliche Anwendbarkeit wird nicht gegeben (Artikel 34(4)(a)(i) PCT).

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Anforderung einer einheitlichen Erfindung (Regel 13.1 PCT).

Wie genauer unter Punkt 5 aufgeführt wird ist ein Verfahren zur Erkennung von Krankheiten im Zusammenhang von Polymorphismen im SREBP Gen neu jedoch nicht erfinderisch. Im Stand der Technik wird der Fachmann motiviert nach Mutationen in SREBP Genen zu suchen, die im Zusammenhang mit Veränderungen im Cholesterin- und LDL- Haushalt stehen. Das der vorliegende Anmeldung zu grunde liegende gemeinsame Konzept, nämlich das Auffinden von Mutationen im SREBP Gen, ist somit nicht erfinderisch. Jede Mutation im SREBP Gen beschreibt somit eine eigene Erfindung. Die vorliegende Anmeldung spaltet sich somit in die zu den gefundenen Mutationen komplementären Primer/Sonden Sequenzen auf (Seq Id 3; Seq Id 7, Seq Id 9; Seq Id 10, Seq Id 11, Seq Id 12, Seq Id 13, Seq Id 14, Seq Id 15, Seq Id 16, Seq Id 17, Seq Id 18). Jede Seq ID beschreibt somit eine eigene Erfindung. Zur Beschleunigung des Verfahrens wird die Anmeldung jedoch als ganzes geprüft.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der

erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf folgende Dokumente verwiesen:

- D1: MISEREZ ANDREW G ET AL: GENOMICS, Bd. 40, Nr. 1, 1997, SISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt
- D2: US-A-5 891 631
- D3: MISEREZ: 'UNI NOVA, WISSENSCHAFTMAGAZIN DER UNIVERSITÄT BASEL, Bd. 81, April 1998 (1998-04), XP002159139
- D4: HUA XIANXIN ET AL: GENOMICS, Bd. 25, Nr. 3, 1995, Seiten 667-673, XP000979463
- D5 Yang J. et al., J. Biological Chemistry, 270, 20, 19.05.1995, pp. 12152-12161
- D6: Hacia J.G. et al., Genomic Research, 8, 12, 12-1998, 1245-1258
- D7: Pai J. et al., J. Biological Chemistry, 273, 40, 02.10.1998, 26138-26148

Die Dokumente D5 und D7 sind nicht im Internationalen Recherchenbericht zitiert. Kopien davon sind als Anlage an diesen Bescheid zu finden (Richtlinien III, 7.24 PCT).

1. Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 1 ist neu (Artikel 33 (2) PCT). Ein Verfahren zur Erkennung eines erhöhten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos in Abhängigkeit des SREBP-Gens ist im Stand der Technik nicht offenbart.
- 1.1 Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 1 ist nicht erfinderisch (Artikel 33 (3) PCT).
D1 wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen. D1 beschreibt die Struktur des menschlichen Gens SREBF2, welches eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Cholesterin Biosynthese und des LDL Stoffwechsels besitzt. Die Möglichkeit von genetischen Variationen in diesem Gen, die zu unterschiedlichen LDL-Niveaus im Plasma führen können wird diskutiert (S. 31, 2. Spalte; S. 32, 1. Spalte 2. Absatz). D1 sagt weiterhin, dass noch über keine "natürlich" vorkommenden Mutationen im SREBF1 und SREBF2 Gen berichtet wurde (S.

32,1. Spalte, letzter Absatz), bezieht sich jedoch gleichzeitig auf eine Publikation von Yang et al. (D5), die über ein verkürztes SREBP-2 protein in Hamsterzellen (CHO) zu berichten weis, siehe z.B.: Diskussion in D5. Weiterhin diskutiert D5 die wichtige Rolle des SREBP-2 Gens in der Regulierung des Cholesterin Metabolismus. D1 führt in seinem letzten Absatz auf Seite 38, 2. Spalte den Fachmann auf die Spur, dass Variationen des SREBF1 und SREBF2 Gens in Zusammenhang mit Abweichungen im Lipidhaushalt auch im menschlichen Genom zu finden seien könnten (im Hinblick auf LDL und Cholesterin-Haushalt, siehe auch D2, Seite 5, 2. Absatz). Auch in D4, einem weiteren Dokument auf dem Gebiet der SREBF-Gene, wird der Zusammenhang von SREBF2 und SREBF1 mit der Cholesterin-Synthese und dem LDL Metabolismus und mögliche phenotypische Effekte welche durch genetische Variationen hervorgerufen werden können, diskutiert (S. 672, 1. Spalte 2. Absatz ff.). D3 beschreibt die SREBP Proteine und Gene als mögliche Zielmoleküle zur Behandlung von Hypercholestrolemia und damit assoziierten Krankheiten (Spalte 2, Zeile 64 ff.). D7, beschreibt mehrere Varianten der SREBP Gene (SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2), welche den Cholesterin- und Fettsäurehaushalt der Zelle modulieren (siehe Diskussion).

Durch die in D1 geführte Diskussion ist der Fachmann über die wichtige Funktion der SREBF Gene (SREBF1 und SREBF2) informiert und durch die Darlegungen aus D3,D4,D5 und D7 hat der Fachmann Anleitung und grösstmögliche Motivation erfahren nach möglichen Mutationen und Polymorphismen in den SREBF Genen, welche im Zusammenhang mit Krankheiten des Cholesterin- und LDL-Haushaltes stehen, zu suchen.

Die Erfordernisse für eine erfinderische Tätigkeit sind somit nicht erfüllt (Artikel 33 (3) PCT).

1.2 Derselben Begründung folgend erfüllen die abhängigen Ansprüche 2-6,10-13, 15-17,19 und die Ansprüche 28 und 29 ebenfalls nicht die Erfordernisse von Artikel 33(3) PCT.

1.3 Der Gegenstand der Ansprüche 7,8,9,14, und 30,31 ist neu (Artikel 33 (2) PCT) jedoch nicht erfinderisch (Artikle 33 (3) PCT).

Im Stand der Technik wird auf Nukleotidvariationen in den Genen SREBP-1 und SREBP-2 hingewiesen. Der Fachmann wird daher veranlasst nach Mutationen in

diesen Genen zu suchen. Dem Auffinden von Mutationen in diesen Genen, durch Sonden, Primer oder durch Restriktionsanalyse kann daher keine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

- 1.4 Der Gegenstand des Anspruchs 18 ist neu (Artikel 33 (2) PCT und erfinderisch (Artikel 33 (3) PCT).

Im Stand der Technik ist kein Zusammenhang zwischen SREBP-1 und SREBP-2 , sowie von Polymorphismen dieser Gene, mit davon abzuleitenden Nebenwirkungen bei einer HIV-Therapie offenbart. Eine erfinderische Tätigkeit kann somit anerkannt werden.

2. Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 20, sowohl der abhängigen Ansprüche 21-27 ist neu (Artikel 33 (2) PCT).

Die Verwendung von DNA- oder RNA-Chips ist ein im Stand der Technik übliches Verfahren um Polymorphismen zu erkennen. Als Beispiel beschreibt D6 die Verwendung von High-Density Oligonucleotide Arrays zur Untersuchung von heterozygoten und homozygoten Sequenzvariation im grossen multiexon ATM Gen (S. 1255, 1. Spalte, 2.Absatz). Mit dem im Stand der Technik (D1-D5) zugänglichen Wissen, aufgeführt in Punkt 1.1 dieses Bescheides, ist somit die Verwendung von DNA oder RNA Chips zur Erkennung von Mutationen in den Genen SREBP-1 UND SREBP-2 für den Fachmann offensichtlich. Eine erfinderische Tätigkeit ist somit nicht erforderlich. Die Erfordernisse von Artikel 33 (3) PCT sind somit für den Gegenstand des Anspruchs 20 nicht erfüllt.

- 2.1 Derselben Begründung folgend erfüllt auch der Gegenstand der Ansprüche 21-24 und 26, 27 nicht die Erfordernisse von erfinderischer Tätigkeit (Artikel 33 (3) PCT).
- 2.2 Dem Gegenstand des Anspruchs 25 kann erfinderische Tätigkeit anerkannt werden (siehe Begründung unter Punkt 1.4 in diesem Bescheid).

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

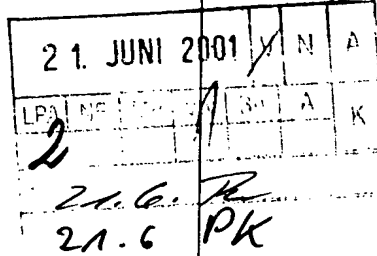
1. Der Inhalt der Zeilen 4-9 auf Seite 1 ist belanglos nach Regel 9.1(iv) PCT.
2. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D3,D5,D6 und D7 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

E. BLUM & Co.
Vorderberg 11
8044 ZÜRICH
SUISSE



PCT

SCHRIFTLICHER BESCHEID
(Regel 66 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 19.06.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
02280PC

ANTWORT FÄLLIG innerhalb von **3 Monat(en)**
ab obigem Absendedatum

Internationales Aktenzeichen
PCT/IB00/00918

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
07/07/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
09/07/1999

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
C12Q1/68

1909

Anmelder

MISEREZ, André, R.

1. Dieser Bescheid ist der **erste** schriftliche Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde

2. Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheides
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

3. Der Anmelder wird **aufgefordert**, zu diesem Bescheid **Stellung zu nehmen**

Wann? Siehe oben genannte Frist. Der Anmelder kann vor Ablauf dieser Frist bei der Behörde eine Verlängerung beantragen, siehe Regel 66.2 d).


Wie? Durch Einreichung einer schriftlichen Stellungnahme und gegebenenfalls von Änderungen nach Regel 66.3. Zu Form und Sprache der Änderungen, siehe Regeln 66.8 und 66.9.

Dazu: Hinsichtlich einer zusätzlichen Möglichkeit zur Einreichung von Änderungen, siehe Regel 66.4.
Hinsichtlich der Verpflichtung des Prüfers, Änderungen und/oder Gegenvorstellungen zu berücksichtigen, siehe Regel 66.4 bis.
Hinsichtlich einer formlosen Erörterung mit dem Prüfer, siehe Regel 66.6.

Wird keine Stellungnahme eingereicht, so wird der internationale vorläufige Prüfungsbericht auf der Grundlage dieses Bescheides erstellt.

4. Der Tag, an dem der internationale vorläufige Prüfungsbericht gemäß Regel 69.2 spätestens erstellt sein muß, ist der: 09/11/2001.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragte Behörde:


Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter / Prüfer

Mueller, F

Formalsachbearbeiter (einschl. Fristverlängerung)

Emslander, S
Tel. +49 89 2399 8718



I. Grundlage des Bescheids

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Bescheids als "ursprünglich eingereicht"*):

Beschreibung, Seiten:

1-54 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-31 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-6, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden und werden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung,
☒ Ansprüche Nr. 1,11.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1,11 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie bitte nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Es kann kein schriftliches Gutachten erstellt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren (Formblatt PCT/IPEA/405) hat der Anmelder:
 - ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
 - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern:
siehe Beiblatt
3. Daher wurde zur Erstellung dieses Bescheids eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - ☒ alle Teile.
 - ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ansprüche	1-17,19-24,26-31
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen:
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Die Ansprüche 1 und 11 haben ein Verfahren zum Gegenstand welches die Blut- bzw. Gewebeentnahme mit einschliesst und haben daher den Anschein eines in vivo Verfahrens. Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 11 fällt somit unter die Verordnung nach Regel 67.1 (iv) PCT und eine Meinung über deren gewerbliche Anwendbarkeit wird nicht gegeben (Artikel 34(4)(a)(i) PCT).

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Anforderung einer einheitlichen Erfindung (Regel 13.1 PCT).

Wie genauer unter Punkt 5 aufgeführt wird ist ein Verfahren zur Erkennung von Krankheiten im Zusammenhang von Polymorphismen im SREBP Gen neu jedoch nicht erfinderisch. Im Stand der Technik wird der Fachmann motiviert nach Mutationen in SREBP Genen zu suchen, die im Zusammenhang mit Veränderungen im Cholesterin- und LDL- Haushalt stehen. Das der vorliegende Anmeldung zu grunde liegende gemeinsame Konzept, nämlich das Auffinden von Mutationen im SREBP Gen, ist somit nicht erfinderisch. Jede Mutation im SREBP Gen beschreibt somit eine eigene Erfindung. Die vorliegende Anmeldung spaltet sich somit in die zu den gefundenen Mutationen komplementären Primer/Sonden Sequenzen auf (Seq Id 3; Seq Id 7, Seq Id 9; Seq Id 10, Seq Id 11, Seq Id 12, Seq Id 13, Seq Id 14, Seq Id 15, Seq Id 16, Seq Id 17, Seq Id 18). Jede Seq ID beschreibt somit eine eigene Erfindung. Zur Beschleunigung des Verfahrens wird die Anmeldung jedoch als ganzes geprüft.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf folgende Dokumente verwiesen:

- D1: MISEREZ ANDREW G ET AL: GENOMICS, Bd. 40, Nr. 1, 1997, SISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt
- D2: US-A-5 891 631
- D3: MISEREZ: 'UNI NOVA, WISSENSCHAFTMAGAZIN DER UNIVERSITÄT BASEL, Bd. 81, April 1998 (1998-04), XP002159139
- D4: HUA XIANXIN ET AL: GENOMICS, Bd. 25, Nr. 3, 1995, Seiten 667-673, XP000979463
- D5 Yang J. et al., J. Biological Chemistry, 270, 20, 19.05.1995, pp. 12152-12161
- D6: Hacia J.G. et al., Genomic Research, 8, 12, 12-1998, 1245-1258
- D7: Pai J. et al., J. Biological Chemistry, 273, 40, 02.10.1998, 26138-26148

Die Dokumente D5 und D7 sind nicht im Internationalen Recherchenbericht zitiert. Kopien davon sind als Anlage an diesen Bescheid zu finden (Richtlinien III, 7.24 PCT).

1. Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 1 ist neu (Artikel 33 (2) PCT).
Ein Verfahren zur Erkennung eines erhöhten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos in Abhängigkeit des SREBP-Gens ist im Stand der Technik nicht offenbart.
- 1.1 Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 1 ist nicht erfinderisch (Artikel 33 (3) PCT).
D1 wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen. D1 beschreibt die Struktur des menschlichen Gens SREBF2, welches eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Cholesterin Biosynthese und des LDL Stoffwechsels besitzt. Die Möglichkeit von genetischen Variationen in diesem Gen, die zu unterschiedlichen LDL-Niveaus im Plasma führen können wird diskutiert (S. 31, 2. Spalte; S. 32, 1.

Spalte 2. Absatz). D1 sagt weiterhin, dass noch über keine "natürlich" vorkommenden Mutationen im SREBF1 und SREBF2 Gen berichtet wurde (S. 32, 1. Spalte, letzter Absatz), bezieht sich jedoch gleichzeitig auf eine Publikation von Yang et al. (D5), die über ein verkürztes SREBP-2 protein in Hamsterzellen (CHO) zu berichten weis, siehe z.B.: Diskussion in D5. Weiterhin diskutiert D5 die wichtige Rolle des SREBP-2 Gens in der Regulierung des Cholesterin Metabolismus. D1 führt in seinem letzten Absatz auf Seite 38, 2. Spalte den Fachmann auf die Spur das vergleichbare Variationen des SREBF1 und SREBF2 Gens, wie in D5 beschrieben wurden, auch im menschlichen Genom zu finden seien und die im weiteren für Krankheiten (im Hinblick auf LDL und Cholesterin-Haushalt, siehe auch D2, Seite 5, 2. Absatz) verantwortlich sein könnten. Auch in D4, einem weiteren Dokument im Gebiet der SREBF-Gene, wird der Zusammenhang von SREBF2 und SREBF1 mit der Cholesterin-Synthese und dem LDL Metabolismus und mögliche phenotypische Effekte welche durch genetische Variationen hervorgerufen werden können, diskutiert (S. 672, 1. Spalte 2. Absatz ff.). D3 beschreibt die SREBP Proteine und Gene als mögliche Zielmoleküle zur Behandlung von Hypercholesterolemia und damit assoziierten Krankheiten (Spalte 2, Zeile 64 ff.). D7, beschreibt mehrere Varianten der SREBP Gene (SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2), welche den Cholesterin- und Fettsäurehaushalt der Zelle modulieren (siehe Diskussion). Durch die in D1 geführte Diskussion ist der Fachmann über die wichtige Funktion der SREBF Gene (SREBF1 und SREBF2) informiert und durch die Darlegungen aus D3, D4, D5 und D7 hat der Fachmann Anleitung und grösstmögliche Motivation erfahren nach möglich Mutationen und Polymorphismen in den SREBF Genen, welche im Zusammenhang mit Krankheiten des Cholesterin- und LDL-Haushaltes stehen, zu suchen. Die Erfordernisse für eine erfindersiche Tätigkeit sind somit nicht erfüllt (Artikel 33 (3) PCT).

- 1.2 Derselben Begründung folgend erfüllen die abhängigen Ansprüche 2-6 10-13, 15-17 19 und die Ansprüche 28 und 29 ebenfalls nicht die Erfordernisse von Artikel 33(3) PCT.
- 1.3 Der Gegenstand der Ansprüche 7,8,9,14, und 30,31 ist neu (Artikel 33 (2) PCT)

jedoch nicht erfinderisch (Artikel 33 (3) PCT).

Im Stand der Technik wird auf Nukleotidvariationen in den Genen SREBP-1 und SREBP-2 hingewiesen. Der Fachmann wird daher veranlasst nach Mutationen in diesen Genen zu suchen. Dem Auffinden von Mutationen in diesen Genen, durch Sonden, Primer oder durch Restriktionsanalyse kann daher keine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

- 1.4 Der Gegenstand des Anspruchs 18 ist neu (Artikel 33 (2) PCT und erfinderisch (Artikel 33 (3) PCT).

Im Stand der Technik ist kein Zusammenhang zwischen SREBP-1 und SREBP-2 , sowie von Polymorphismen dieser Gene, mit davon abzuleitenden Nebenwirkungen bei einer HIV-Therapie offenbart. Eine erfinderische Tätigkeit kann somit anerkannt werden.

2. Der Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 20, sowohl der abhängigen Ansprüche 21-27 ist neu (Artikel 33 (2) PCT).

Die Verwendung von DNA- oder RNA-Chips ist ein im Stand der Technik übliches Verfahren um Polymorphismen zu erkennen. Als Beispiel beschreibt D6 die Verwendung von High-Density Oligonucleotide Arrays zur Untersuchung von heterozygoten und homozygoten Sequenzvariation im grossen multiexon ATM Gen (S. 1255, 1. Spalte, 2.Absatz). Mit dem im Stand der Technik (D1-D5) zugänglichen Wissen, aufgeführt in Punkt 1.1 dieses Bescheides, ist somit die Verwendung von DNA oder RNA Chips zur Erkennung von Mutationen in den Genen SREBP-1 UND SREBP-2 für den Fachmann offensichtlich. Eine erfinderische Tätigkeit ist somit nicht erforderlich. Die Erfordernisse von Artikel 33 (3) PCT sind somit für den Gegenstand des Anspruchs 20 nicht erfüllt.

- 2.1 Derselben Begründung folgend erfüllt auch der Gegenstand der Ansprüche 21-24 und 26, 27 nicht die Erfordernisse von erfinderischer Tätigkeit (Artikel 33 (3) PCT).
- 2.2 Dem Gegenstand des Anspruchs 25 kann erfinderische Tätigkeit anerkannt werden (siehe Begründung unter Punkt 1.4 in diesem Bescheid).

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Der Inhalt der Zeilen 4-9 auf Seite 1 ist belanglos nach Regel 9.1(iv) PCT.
2. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D3,D5,D6 und D7 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Europäisches Patentamt
D-80298 München

UPS

Zürich, 17. September 2001
Patente Dr. PK
Unsere Akte: 02280PC

Internationale Patentanmeldung PCT/IB00/00918
Anmelder: Miserez André, R.

Sehr geehrte Damen und Herren

In Antwort auf den ersten schriftlichen Bescheid gemäss Artikel 34(1) c und Regel 66(2) c PCT finden Sie anbei unseren Kommentar zu den gemachten Einwänden.

Zu Punkt III des Bescheids

Die Ansprüche 1 und 11 haben kein Verfahren gemäss der Regel 67.1(iv) PCT zum Gegenstand, da der Schritt der Blut- oder Gewebeentnahme nicht zum beanspruchten Verfahren gehört (siehe Wortlaut der Ansprüche 1 und 11) d.h. die Verfahren beinhalten keinen Schritt, der am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen wird. Die beanspruchten Verfahren sind daher gemäss Artikel 34(4)(a)i PCT gewerblich anwendbar.

Zu Punkt IV des Bescheids

Die vorliegende Anmeldung erfüllt die Anforderung der Einheitlichkeit gemäss Regel 13.1 PCT.

Das der Anmeldung zu grunde liegende gemeinsame Konzept, nämlich das Auffinden von krankheitsassoziierte Polymorphismen in den SREB-Proteinen, ist gegenüber den zitierten Dokumenten des Standes der Technik neu und beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit (siehe unten zu Punkt V, 1.1-1.3).

Die vorliegende Anmeldung erfüllt daher die Anforderung der Einheitlichkeit gemäss R. 13.1 PCT.

Zu Punkt V des Bescheids

Zu Punkten 1.1-1.3

Die Ansprüche 1-17, 19 sowie 28-31 sind neu und beruhen gegenüber den Dokumenten D1, D2, D3-D5 und D7 auf einer erfinderischen Tätigkeit.

Die vorliegende Erfindung hat die Aufgabe verbesserte Mittel zur Frühdiagnose und Therapie von Risikopatienten zu Verfügung zu stellen.

Die Lösung dieser Aufgabe durch ein erfindungsgemässes Verfahren erfüllt die Bedingung der erfinderischen Tätigkeit gegenüber den zitierten Dokumenten.

Im Verfahren gemäss Anspruch 1 wird ein Polymorphismus in mindestens einem SREB Protein untersucht. Auf der Seite 4 unten und Seite 5 oben der vorliegenden Anmeldung wird definiert, welche Bedeutung der Begriff „Polymorphismus“ im Rahmen der vorliegenden Anmeldung hat. Diese Definition umfasst nur natürliche im Menschen vorkommende Sequenzvariationen.

D1 offenbart auf S. 38, 2. Spalte, dass die Wirkung von ähnlichen Mutationen, wie sie in Hamsterzellen gefunden wurden, im menschlichen SREBF1 und SREBF2 Gen auf den Lipidstoffwechsel nicht vorausgesagt werden können, da noch zu wenige in vivo Daten für die vorliegen. Die Hamsterzelllinien wurden mittels Behandlung mit Mutagenen hergestellt und es handelt sich somit bei den Mutationen in den SREBP Genen der Hamsterzellen keinesfalls um natürliche Mutationen (siehe auch unter D5).

In D4 auf S.672, Spalte 1, 2. Abschnitt wird klar gesagt, dass keine menschlichen Krankheiten mit Mutationen in den SREBP Genen bekannt sind. Die Autoren halten bloss fest, dass rein theoretisch Mutationen in diesen Genen einen Einfluss auf die Plasmakonzentration von LDL Cholesterol haben könnten. Dabei handelt es sich bloss um eine allgemeine Aussage der Autoren, die für jedes Gen gemacht werden kann, und sich auf keinerlei Fakten stützen kann. Eine solche allgemeine Aussage ist für den Fachmann keine Motivation gezielt nach krankheitsassoziierten Mutationen in den menschlichen SREBP Genen zu suchen, da kaum Aussicht auf Erfolg besteht.

D3 enthält keine Hinweise, dass natürliche Mutationen in den menschlichen SREBP Genen mit Krankheiten des Menschen in Verbindung stehen. Vielmehr betont das Dokument, dass keine Mutationen in den SREBP-Genen beim Menschen bekannt sind (2. letzte Seite).

D5 beschreibt drei Hamsterzelllinien, welche mutierte SREBP-2 Gene aufweisen. Die Zellen exprimieren konstitutiv-aktive verkürzte SREB Proteine. Die Zelllinien wurden durch Behandlung von Mutagenen hergestellt und stellen daher kein natürliches System dar. Auch in diesem Dokument findet sich kein Hinweis auf entsprechende Mutationen in den menschlichen Genen, die im Zusammenhang mit Krankheiten stehen.

In D7 werden CHO-Zelllinien beschrieben, die unterschiedliche Mengen der nukleären Varianten der SREB Proteine exprimieren. Bei den beschriebenen SREB Proteinen handelt es sich um Proteine, die durch unterschiedliche Gene kodiert werden oder ein unterschiedliches erstes Exon aufweisen, und nicht um Mutanten (siehe S. 26138, rechte Spalte, 3 Absatz).

Der Fachmann kann u.E. aus D1 und D4 nur entnehmen, dass es absolut keine Hinweise auf das Vorhandensein von Mutationen in den menschlichen SREBF Genen gibt, die in einem Zusammenhang mit menschlichen Krankheiten stehen könnten. Die in vitro Modellsysteme (Hamsterzelllinien) von D5 wurden künstlich mittels Behandlung der Zellen mit Mutagenen hergestellt und die dadurch induzierten Mutationen können keinesfalls als natürlich bezeichnet werden.

Die im ersten schriftlichen Bescheid gezogene Schlussfolgerung, dass solche künstlich induzierten Mutationen auch in den menschlichen Genen gefunden werden und mit Krankheiten assoziiert sind, findet keinerlei Stützung in den zitierten Dokumenten. Die Behauptung, dass der Fachmann in den humanen Genen Mutationen gemäss D5 gesucht hätte, belegt höchstens, dass der Fachmann die erfindungsgemässen Polymorphismen nicht gesucht hätte, da diese nicht zu einer Verkürzung des Proteins, ja der eine nicht einmal zu einer anderen Aminosäure führen!

Der Fachmann wird u.E. sogar entmutigt nach Mutationen in den menschlichen SREBP Genen zu suchen, da gemäss D1 von den *in vitro* Daten aus den Zellkulturstudien nicht auf die *in vivo* Funktion/Regulation dieser Proteine geschlossen werden kann (D1, S. 38, linke Spalte, Zeile 6 ff.). Die Autoren weisen also ausdrücklich auf die sehr begrenzte Aussagekraft von *in vitro* Studien hin und relativieren deren Bedeutung für die *in vivo* Verhältnisse.

Der Fachmann kann einer Kombination der zitierten Dokumente nur entnehmen, dass die SREBP Gene im Menschen vorhanden sind, deren genaue *in vivo* Funktion und Regulation (ausser deren Beteiligung im Cholesterinstoffwechsel) jedoch unbekannt ist und keine natürliche Mutationen in diesen Genen in Organismen bekannt sind. Es liegen daher keinerlei schlüssige Hinweise vor, die einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen/Mutationen in den menschlichen SREBP Genen und Krankheiten des Menschen herstellen.

Die obengenannten Ansprüche beruhen daher gegenüber den zitierten Dokumenten auf einer erfinderischen Tätigkeit.

Zu Punkt 1.4.

Wir stimmen der mit der vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde zu, dass der Anspruch 18 neu ist und auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht.

Zu Punkten 2 und 2.1

Die Ansprüche 20-24 sowie 26 und 27 sind aus den unter den Punkten 1.1-1.3 aufgeführten Gründen neu und beruhen auf einer erfinderischen Tätigkeit gegenüber D1-D6.

Zu Punkt 2.2

Wir stimmen der mit der vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde zu, dass der Anspruch 25 neu ist und auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht.

Zu Punkt VII

Zu Punkt 1.

Der Verweis in der vorliegenden Anmeldung auf die Schweizer Prioritätsanmeldung ist nicht belanglos gemäss Regel 9.1(iv) PCT.

Dieser Verweis ist keinesfalls belanglos, da dadurch die Offenbarung der Prioritätsanmeldung in gewissen Ländern als in die vorliegende Anmeldung aufgenommen gilt, und hat vor allem für die USA Bedeutung.

Zu Punkt 2

Ein Hinweis auf die Dokumente des Standes der Technik wird im Verlauf des Erteilungsverfahrens während der nationalen/regionalen Phase in die Patentbeschreibung aufgenommen werden.

Mit freundlichen Grüssen
E. BLUM & CO
i.V.

i.A.

Dr. R. Rüedi

Dr. P. Küng

Beilage:
Eingangsbestätigung mit Rückantwortcouvert

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

E. BLUM & CO.
Vorderberg 11
CH-8044 Zürich
SUISSE

28. JULI 2000				V	N	A
LPA	NF	12	1	Bo	A	
21						
1	2	3	4	5	6	7
2						

Date of mailing (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 02280PC	International application No. PCT/IB00/00918

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

MISEREZ, André, R. (all designated States)

International filing date : 07 July 2000 (07.07.00)
 Priority date(s) claimed : 09 July 1999 (09.07.99)
 Date of receipt of the record copy
 by the International Bureau : 11 July 2000 (11.07.00)
 List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☐ confirmation of precautionary designations
☐ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Peggy Steunenbergh

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

E. BLUM & CO.
Vorderberg 11
CH-8044 Zürich
SUISSE

Date of mailing (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	
Applicant's or agent's file reference 02280PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/IB00/00918	International filing date (day/month/year) 07 July 2000 (07.07.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 09 July 1999 (09.07.99)
Applicant MISEREZ, André, R.	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
09 July 1999 (09.07.99)	1277/99	CH	11 July 2000 (11.07.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Peggy Steunenberger Telephone No. (41-22) 338.83.38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) 02280PC

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG DNA-Polymorphismen in Sterol-Regulator
Element-Bindenden Proteinen

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MISEREZ André R.
St. Jakobstrasse 70
CH-4147 Aesch

☒ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

CH

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

E. Blum & Co.
Vorderberg 11
CH-8044 Zürich
Schweiz

Telefonnr.:

01/261 54 54

Telefaxnr.:

01/251 67 17

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Feld Nr. V BESTIMMUNG DER STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mosambik, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua und Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mosambik |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algerien | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:



Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄT ANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weiterer Prioritätsanspruch ist im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) (09.07.99) 9. Juli 1999	1277/99	CH		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☐ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE			
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)		Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):	
ISA / EP		Datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen
		Staat (oder regionales Amt)	

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE	
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:	Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
Antrag : 3	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 54	2. <input checked="" type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Ansprüche : 6	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
Zusammenfassung : 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
Zeichnungen : 4	5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: (1)
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 6	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
Blattzahl insgesamt : 74	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
	8. <input checked="" type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
	9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):	Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:
keine	Deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS	
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.	
E. Blum & Co. i.V.	Zürich, 6. Juli 2000 rw
Paul Ronchi	

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	<input type="checkbox"/> eingegangen:
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	<input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

Der Antrag ist bei der zuständigen mit internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einzureichen, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ EP

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird und benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (soweit nichts anderes angegeben).

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 02280PC
Internationales Aktenzeichen PCT/IB00/00918	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 7. Juli 2000 (07.07.00)	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 9. Juli 1999 (09.07.99)
Bezeichnung der Erfindung DNA-POLYMORPHISMEN IN STEROL-REGULATOR ELEMENT-BINDENDEN PROTEINEN		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) MISEREZ André R. St. Jakobstrasse 70 CH-4147 Aesch Schweiz		Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): CH	Sitz oder Wohnsitz (Staat): CH	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)		
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)		
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
 und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

E. Blum & Co.
 Vorderberg 11
 CH-8044 Zürich
 Schweiz

Telefonnr.:

0041 1 261 54 54

Telefaxnr.:

0041 1 251 67 17

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV GRUNDLAGE DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG**Erklärung betreffend Änderungen:***

1. Der Anmelder wünscht, daß die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage

☒ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung
 der Beschreibung ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34

der Patentansprüche ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 19
 (ggf. zusammen mit Begleitschreiben)
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34

der Zeichnungen ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34
 aufgenommen wird.

2. ☐ Der Anmelder wünscht, daß jegliche nach Artikel 19 eingereichte Änderung der Ansprüche als überholt angesehen wird.

3. ☐ Der Anmelder wünscht, daß der Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufgeschoben wird, sofern die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 Absatz d). (Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Sprache für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung: Deutsch ;

☒ dies ist die Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wurde.
☐ dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde.
☐ dies ist die Sprache der Veröffentlichung der internationalen Anmeldung.
☐ dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht wurde/wird.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

Der Anmelder benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II gebunden sind)

mit Ausnahme der folgenden Staaten, die der Anmelder nicht benennen möchte:

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung in der in Feld Nr. IV angegebenen Sprache bei:

- | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------|---|---------|
| 1. Übersetzung der internationalen Anmeldung | : | Blätter |
| 2. Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Begleitschreiben | : | Blätter |
| 6. Sonstige (einzeln aufführen) | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung | 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift |
| 2. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 5. <input type="checkbox"/> Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzprotokoll in computerlesbarer Form |
| 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): | 6. <input type="checkbox"/> sonstige (einzeln aufführen): |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

E. Blum & Co.
i.V.

Zürich, 26. Januar 2001 rw

Kurt Sutter

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1 Absatz b:

3. ☐ Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung.

☐ Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet

4. ☐ Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.

5. ☐ Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/04352 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB00/00918

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juli 2000 (07.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
1277/99 9. Juli 1999 (09.07.1999) CH

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MISEREZ, André, R. [CH/CH]; St. Jakob-
strasse 70, CH-4147 Aesch (CH).

(74) Anwalt: E. BLUM & CO.; Vorderberg 11, CH-8044
Zürich (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:

2. August 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DNA POLYMORPHISMS IN STEROL REGULATOR ELEMENT BINDING PROTEINS

(54) Bezeichnung: DNA-POLYMORPHISMEN IN STEROL-REGULATOR ELEMENT-BINDENDEN PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA polymorphisms in sterol regulator element binding proteins (SREBP) that are characteristic of a higher risk of genetic diseases in humans such as hypercholesterolaemia. The corresponding polymorphisms, especially the polymorphisms on SREBP-1 and SREBP-2 are frequently observed in Alzheimer patients (SREBP-2). They are also characterized by a specific behavior in the therapy of HIV patients with protease inhibitors and appear to have an influence on the mortality.

(57) Zusammenfassung: Es werden Polymorphismen in Sterol-Regulator Element-Bindenden-Proteinen (SREBP) beschrieben, die charakteristisch für erhöhtes Risiko genetisch bedingter Krankheiten beim Menschen, wie Hypercholesterinämie, sind. Die entsprechenden Polymorphismen, insbesondere Polymorphismen auf SREBP-1 und SREBP-2, zeigen darüber hinaus auch sehr interessante Häufung bei Alzheimer-Patienten (SREBP-2), spezielles Verhalten bei Therapie mit Protease-Hemmern bei HIV-Patienten sowie einen Einfluss auf die Mortalität.

WO 01/04352 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

T/IB 00/00918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MISEREZ ANDREW G ET AL: "Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2)." GENOMICS, vol. 40, no. 1, 1997, pages 31-40, XP002159138 ISSN: 0888-7543 cited in the application the whole document --- -/--	1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 2001

Date of mailing of the international search report

22/02/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/B 00/00918

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MISEREZ: "Die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts" UNI NOVA, WISSENSCHAFTSMAGAZIN DER UNIVERSITÄT BASEL, 'Online! vol. 81, April 1998 (1998-04), XP002159139 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.zuv.unibas.ch/uni_nova/081/11.shtml> 'retrieved on 2001-01-30! cited in the application the whole document	1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27
X	US 5 891 631 A (WANG XIAODONG ET AL) 6 April 1999 (1999-04-06) column 1-3 column 7-11 column 31-36; examples 3,4	1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27
X	HUA XIANXIN ET AL: "Structure of the Human Gene Encoding Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBF1) and Localization of SREBF1 and SREBF2 to Chromosomes 17p11.2 and 22q13." GENOMICS, vol. 25, no. 3, 1995, pages 667-673, XP000979463 ISSN: 0888-7543 cited in the application the whole document	1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27
A	WANG XIAODONG ET AL: "Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis" THE EMBO JOURNAL, vol. 15, no. 5, 1996, pages 1012-1020, XP002159140 page 1015; figure 6	1-31
A	BROWN MS UND GOLDSTEIN JL: "The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 89, 2 May 1997 (1997-05-02), pages 331-340, XP002123067 ISSN: 0092-8674 cited in the application the whole document	1-31

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 00/00918

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SHIMANO HITOSHI IICHIRO SHIMOMURA ET AL: "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 100, no. 8, 1997, pages 2115-2124, XP002931070 ISSN: 0021-9738 the whole document</p>	1-31
A	<p>HACIA JOSEPH G ET AL: "Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays." GENOME RESEARCH, vol. 8, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 1245-1258, XP002925459 ISSN: 1088-9051 the whole document</p>	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/93/00918

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5891631 A	06-04-1999	US 5527690 A	18-06-1996
		US 5498696 A	12-03-1996
		AU 6911194 A	12-12-1994
		EP 0698115 A	28-02-1996
		WO 9426922 A	24-11-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

T/IB 00/00918

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MISEREZ ANDREW G ET AL: "Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2)." GENOMICS, Bd. 40, Nr. 1, 1997, Seiten 31-40, XP002159138 ISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Februar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/02/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

P/B 00/00918

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MISEREZ: "Die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts"</p> <p>UNI NOVA, WISSENSCHAFTSMAGAZIN DER UNIVERSITÄT BASEL, 'Online!</p> <p>Bd. 81, April 1998 (1998-04), XP002159139</p> <p>Gefunden im Internet: <URL:http://www.zuv.unibas.ch/uni_nova/081/11.shtml> 'gefunden am 2001-01-30! in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
X	<p>US 5 891 631 A (WANG XIAODONG ET AL) 6. April 1999 (1999-04-06)</p> <p>Spalte 1-3 Spalte 7-11 Spalte 31-36; Beispiele 3,4</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
X	<p>HUA XIANXIN ET AL: "Structure of the Human Gene Encoding Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBF1) and Localization of SREBF1 and SREBF2 to Chromosomes 17p11.2 and 22q13."</p> <p>GENOMICS, Bd. 25, Nr. 3, 1995, Seiten 667-673, XP000979463 ISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
A	<p>WANG XIAODONG ET AL: "Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis"</p> <p>THE EMBO JOURNAL, Bd. 15, Nr. 5, 1996, Seiten 1012-1020, XP002159140 Seite 1015; Abbildung 6</p>	<p>1-31</p>
A	<p>BROWN MS UND GOLDSTEIN JL: "The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor"</p> <p>CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 89, 2. Mai 1997 (1997-05-02), Seiten 331-340, XP002123067 ISSN: 0092-8674 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	<p>1-31</p>

-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SHIMANO HITOSHI IICHIRO SHIMOMURA ET AL: "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 100, Nr. 8, 1997, Seiten 2115-2124, XP002931070 ISSN: 0021-9738 das ganze Dokument ----	1-31
A	HACIA JOSEPH G ET AL: "Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays." GENOME RESEARCH, Bd. 8, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 1245-1258, XP002925459 ISSN: 1088-9051 das ganze Dokument -----	1-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

P 3 00/00918

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5891631 A	06-04-1999	US 5527690 A	18-06-1996
		US 5498696 A	12-03-1996
		AU 6911194 A	12-12-1994
		EP 0698115 A	28-02-1996
		WO 9426922 A	24-11-1994
<hr/>			

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/04352 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB00/00918

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juli 2000 (07.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
1277/99 9. Juli 1999 (09.07.1999) CH

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MISEREZ, André, R. [CH/CH]; St. Jakob-
strasse 70, CH-4147 Aesch (CH).

(74) Anwalt: E. BLUM & CO.; Vorderberg 11, CH-8044
Zürich (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DNA POLYMORPHISMS IN STEROL REGULATOR ELEMENT BINDING PROTEINS

WO 01/04352 A2

(54) Bezeichnung: DNA-POLYMORPHISMEN IN STEROL-REGULATOR ELEMENT-BINDENDEN PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA polymorphisms in sterol regulator element binding proteins (SREBP) that are characteristic of a higher risk of genetic diseases in humans such as hypercholesterolaemia. The corresponding polymorphisms, especially the polymorphisms on SREBP-1 and SREBP-2 are frequently observed in Alzheimer patients (SREBP-2). They are also characterized by a specific behavior in the therapy of HIV patients with protease inhibitors and appear to have an influence on the mortality.

(57) Zusammenfassung: Es werden Polymorphismen in Sterol-Regulator Element-Bindenden-Proteinen (SREBP) beschrieben, die charakteristisch für erhöhtes Risiko genetisch bedingter Krankheiten beim Menschen, wie Hypercholesterinämie, sind. Die entsprechenden Polymorphismen, insbesondere Polymorphismen auf SREBP-1 und SREBP-2, zeigen darüber hinaus auch sehr interessante Häufung bei Alzheimer-Patienten (SREBP-2), spezielles Verhalten bei Therapie mit Protease-Hemmern bei HIV-Patienten sowie einen Einfluss auf die Mortalität.

DNA-Polymorphismen in Sterol-Regulator Element-Bindenden Proteinen

Verweis auf entsprechende Anmeldungen

5

Die vorliegende Anmeldung beansprucht die Priorität der Schweizer Anmeldung Nr. 1277/99 vom 9. Juli 1999, deren Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

10

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft Polymorphismen, insbesondere Desoxyribonukleinsäuren (DNA oder DNS)-Polymorphismen, in Sterol-Regulator Element-Bindenden Proteinen, insbesondere Protein-1 (SREBP-1) und Protein-2 (SREBP-2), resp. die Verwendung solcher Polymorphismen für die Diagnostik, aber auch für das Wirkstoff-Screening.

20

Stand der Technik

Epidemiologische Langzeitstudien haben in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Faktoren identifiziert, die die Atherosklerose-Entstehung beschleunigen, und damit die Entstehung von Herzinfarkten fördern. Trotz der Vermeidung von Umweltfaktoren und von Verhaltensweisen, die das Atherosklerose-Risiko erhöhen, kann es schon bei jüngeren Erwachsenen zu ausgeprägten atherosklerotischen Veränderungen bis hin zum Herzinfarkt kommen. In solchen Fällen spielen Erbfaktoren eine entscheidende Rolle. Es ist beispielsweise bekannt, dass Defekte von Genen, die im Cholesterinstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, die Medikation mit cholesterinsenkenden Mitteln erfordern. Durch die frühzeitige Erkennung eines genetischen Defekts lassen sich so rechtzeitig Gegenmassnahmen ergreifen.

Es ist deshalb sowohl vom diagnostischen als auch vom therapeutischen Standpunkt aus sehr wünschenswert wesentliche genetische Veränderungen erkennen und nachweisen zu können (siehe A. R. Miserez, Die Bedeutung
5 genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts, uni nova, April 1998, S. 44-52).

Cholesterin ist, neben seiner Eigenschaft als Vorläufer von Steroidhormonen und Gallensäuren, ein essentieller Bestandteil der Zellmembranen, der die Permeabilität der letzteren entscheidend beeinflusst. Menschliche Zellen kontrollieren ihren intrazellulären Cholesteringehalt in engen Grenzen durch die Regulation der rezeptorvermittelten Aufnahme extrazellulärer, cholesterinenthaltender Lipoproteinpartikel niedriger Dichte (low
10 density lipoproteins, LDL) und durch die Steuerung der intrazellulären Cholesterinbiosynthese. LDL-Partikel binden sich an den LDL-Rezeptor (LDLR) mittels ihrer Apolipoprotein (Apo) B-Anteile. Die Bindung und die nachfolgende Internalisierung dieser Lipoprotein-Rezeptor-Komplexe kann teilweise oder vollständig unterbrochen sein,
15 wenn eines der an diesem Prozess beteiligten Proteine defekt ist oder fehlt. Mutationen der Gene, die das Apolipoprotein E (Mutationen führen zu familiärer Dysbetalipoproteinämie (FBL)), das Apolipoprotein B-100 (Mutationen
20 führen zu familiär-defektivem Apo B (FDB)), sowie den LDL-Rezeptor (Mutationen führen zu familiärer Hypercholesterinämie (FH)) kodieren, resultieren in einer Ansammlung von cholesterinenthaltenden Partikeln im Plasma, was mit einem Anstieg des Risikos für koronare Herzkrankheit
30 einhergeht. Mit diese Mutationen können aber in den meisten untersuchten Populationen nur 4.2 bis 7 % der Fälle mit Hypercholesterinämie (definiert als die 10 % der Personen einer Population mit LDLC-Konzentrationen über dem 90ten Perzentil) erklärt werden. Folglich sind die bei
35 der Mehrzahl der betroffenen Personen mit erhöhtem Plasma-LDLC ursächlichen Gendefekten noch nicht identifiziert.

Die Promotoren des LDLR-Gens sowie der Gene, die in der Cholesterinbiosynthese eine Rolle spielen, wie zum Beispiel die Hydroxymethylglutaryl-(HMG)-CoA-Synthase-, die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase- und die Squalen-Synthase-Gene, enthalten spezifische Nukleotidsequenzen, die sogenannten Sterol-Regulator-Elemente (SRE).

Es ist ebenfalls bereits bekannt, dass zwei Proteine, die SRE-bindenden Proteine SREBP-1 und SREBP-2, an die SRE in den Promotoren dieser Gene binden und deren Transkriptionsrate aktivieren. Bei einem Mangel an Sterolen innerhalb der Zelle werden beide Proteine durch jeweils zwei proteolytische Schritte aktiviert, zunächst durch einen Sterol (bzw. Cholesterol)-sensitiven Schritt und danach durch einen Sterol-unabhängigen Schritt. Durch diese Proteolyseschritte entstehen 68 kDa grosse Proteine aus der NH₂ Region der sich im Zytoplasma befindlichen SREBP-1- und SREBP-2-Vorläuferproteine. Die am Amino-Ende freigesetzte, reife Form der Transkriptionsfaktoren wandert in den Zellkern und bindet sich an die SRE der Promotoren von Cholesterin-regulierenden Genen. In der Folge werden diese Gene aktiviert, was zu einer Erhöhung der rezeptorvermittelten Aufnahme von LDL und zu einer verstärkten intrazellulären Cholesterinbiosynthese führt.

Sobald sich Cholesterin in der Zelle anhäuft, wird der erste, Cholesterin-empfindliche Schritt inhibiert, die reifen Formen der SREBP verschwinden und die Transkriptionsraten vermindern sich, wodurch eine zu grosse Akkumulation von Cholesterin in der Zelle verhindert wird. SREBP-1 und SREBP-2 regulieren zahlreiche SRE-enthaltende Gene, die in die Cholesterin-Homöostase involviert sind, SREBP-1 aktiviert zusätzlich die HMG-CoA-Reduktase und die Squalen-Synthase. SREBP-1 und SREBP-2 sind Mitglieder der sogenannten basischen Helix-Loop-Helix Leucine Zipper Transkriptionsfaktor-Familie. Die Gene, die diese Faktoren kodieren, wurden kürzlich kloniert und in ihrer genetischen Struktur charakterisiert (20, 21).

Trotz all dieser bereits gewonnenen Erkenntnisse liegt aber - wie bereits oben erwähnt - die Zahl der erkennbaren Risikopatienten für z.B. Hypercholesterinämie bei unter 7 %.

5 Ziel der vorliegenden Erfindung war es deshalb, die Frühdiagnose und die Therapie von Risikopatienten zu verbessern.

 Dieses Ziel wurde dadurch erreicht, dass Diagnoseverfahren sowie für deren Durchführung geeignete Polymorphismen auf den SREBP-Genen bereitgestellt werden, insbesondere Polymorphismen, die bei einem Teil der Patienten mit Änderungen im Lipidhaushalt, insbesondere im Cholesterinhaushalt, vorzugsweise bei einem bedeutenden Teil solcher Patienten, auftreten.

15

Darstellung der Erfindung

 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist folglich ein Verfahren zur Erkennung eines erhöhten oder erniedrigten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos und/oder einer erhöhten oder erniedrigten Sensitivität auf Therapieverfahren resp. deren Nebenwirkungen.

 Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind die Verwendung von Polymorphismen zur Diagnose, zur Beurteilung von Behandlungen gegen Krankheiten und zum Wirkstoffscreening, sowie die Bereitstellung geeigneter Polymorphismen.

 Überraschenderweise wurde gefunden, dass Polymorphismen auf Sterol-Regulator Element-Bindenden-Proteinen (SREBP), insbesondere SREBP-1 und SREBP-2, Indikatoren für Gesundheits- resp. Therapierisiken sind. Das erfindungsgemäße Verfahren ist deshalb dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme, das Blut resp. Gewebe auf das Vorhandensein eines Polymorphismus in mindestens einem SREBP untersucht wird, wobei das Vorhandensein eines Polymorphismus auf Amino- und/oder Nukleinsäure-Ebene bestimmt werden kann. Der Begriff Poly-

morphismus, wie er im Rahmen dieser Erfindung gebraucht wird, beschreibt jede natürlich im Menschen vorkommende Sequenzvariation, vorzugsweise aber eine Sequenzvariation, die bei einem grossen Bevölkerungsanteil vorkommt.

- 5 In einem bevorzugten Verfahren werden entsprechende Nukleinsäuresequenzen, die einen charakteristischen Polymorphismus aufweisen, insbesondere einen Polymorphismus von SREBP-1 und/oder SREBP-2, auf einem DNA- und/oder RNA-Chip verwendet, sog. Microarray (DNA Chip)
- 10 Technologie. Andere Verfahren sind beispielsweise PCR und darauffolgende Restriktionsenzymverdauung, beispielsweise mit *Msp* I bzw. *Xmn* I; "Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)"-Verfahren; "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)"-Verfahren; "Protein Truncation
- 15 Test (PTT)"-Verfahren; "Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)"-Verfahren; "Cleavage Fragment Length Polymorphisms (CFLP)"-Verfahren; "Chemical Cleavage of Mismatches"-Verfahren; Sequenzierung; Minisequenzierung (Snap-shot-Sequenzierung); auf "High Pressure Liquid
- 20 Chromatography (HPLC)" basierende Verfahren (dHPLC); auf Massenspektroskopie basierende Verfahren; Dot blot-Verfahren (allelspezifische Oligonukleotide); allelspezifisches PCR-Verfahren (allelspezifische Oligonukleotide); "Real-Time" quantitative PCR-Spectrophotometrie (z.B.
- 25 TaqMan™, Light Cycler™); und "Luminescent non-gel based molecular interrogation".

- Mit den im Rahmen dieser Erfindung speziell interessierenden Polymorphismen, insbesondere jenen, die auf den SREBP-1 und SREBP-2 Genen gefunden wurden, geht
- 30 eine geänderte Funktionsfähigkeit der Proteine einher. In Anwesenheit der unten näher beschriebenen Mutationen im SREBP-1- und SREBP-2-Gen beispielsweise wird das LDL-Rezeptorgen weniger oder besser aktiviert, was zu veränderten Cholesterinspiegeln beim Menschen führt.

- 35 Ferner wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, dass entsprechende Polymorphismen Indikatoren für erhöhtes oder erniedrigtes Krankheitsrisiko

sind, insbesondere für erhöhtes resp. erniedrigtes Risiko an Hypercholesterinämie oder der Alzheimer-Krankheit zu erkranken. Sie ermöglichen auch die Beurteilung des Risikos für das Auftreten von Problemen bei der HIV-Therapie, insbesondere der Therapie mit Protasehemmern, und ermöglichen das Abschätzen des Risikos für die Entwicklung irgendeiner mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbundenen Erkrankung, dies auch unabhängig von einer gegebenenfalls assoziierten Cholesterinmodifikation oder Alzheimer-Krankheit.

Die Erfindung wird unten und in den Figuren näher beschrieben.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

15

Figur 1A zeigt ein Chromatogram zur Identifizierung des Exon-Polymorphismus in SREBP-1, und den ermittelten Polymorphismus, nämlich eine Mutation im SREBP-1 Gen (Exon 18c) an Aminosäureposition 1028 (G1028G), die zu keinem Aminosäureaustausch führt, aber eine *Xmn* I Restriktionsschnittstelle generiert.

Figur 1B zeigt ein Chromatogram zur Identifizierung des Exon-Polymorphismus in SREBP-2 und den ermittelten Polymorphismus, nämlich eine Mutation im SREBP-2 Gen (Exon 10) an Aminosäureposition 595 (A595G), die zu einer Aminosäuresubstitution führt (Alanin zu Glycin) und eine zusätzliche *Msp* I Restriktionsschnittstelle generiert.

Figur 2A zeigt, wie mittels PCR Amplifikation des ganzen Exon 18c (SREBP-1) und darauffolgende Restriktionsenzymverdauung homozygote und heterozygote Träger der entsprechenden Mutation beim Screenen von grossen Personenkollektiven mit hohem Durchsatz identifiziert werden können.

Figur 2B zeigt, wie mittels PCR Amplifikation des 5'-Endes von Exon 10 (SREBP-2) und darauffolgende Restriktionsenzymverdauung homozygote und heterozygote Trä-

ger der entsprechenden Mutation beim Screenen von grossen
Personenkollektiven mit hohem Durchsatz identifiziert
werden können.

Figur 3 zeigt für SREBP-1 und für SREBP-2 den
5 Vergleich zwischen Trägern und Nicht-Trägern der Polymor-
phismen hinsichtlich der entsprechenden, gemittelten Ge-
samt-Cholesterinkonzentrationen und der Gen-Gen Interak-
tionen mit dem Apolipoprotein E-Gen.

Figur 4 zeigt die prozentuale Aenderung der
10 Plasmacholesterinspiegel vor und nach Gabe von Protease-
hemmern in Abhängigkeit vom G1028G Polymorphismus.

Wege zur Ausführung der Erfindung

15 Polymorphismen in den SREBP-Genen allgemein
können, wie unten für die SREBP-1- und SREBP-2-Gene be-
schrieben, ermittelt werden.

Die speziellen Polymorphismen können z.B. da-
durch bestimmt werden, dass Oligonukleotide entworfen
20 werden, die den Intron-Sequenzen der SREBP-1- und SREBP-
2-Gene entsprechen, die unmittelbar den Exon-/Intron-
Grenzen benachbart sind, und dass mittels der Einzel-
Strang-Konformations-Polymorphismus-Methode (SSCP) beide
Gene für Sequenzvariationen getestet werden.

25 Auf diese Weise wurden die folgenden relativ
häufig auftretenden Polymorphismen gefunden, die jeweils
dem normalen Gen gegenübergestellt werden, wobei NS die
Nukleotidsequenz und AS die Aminosäuresequenz bedeuten:

30 **SREBP-1 (Wild-Typ):**

NS G CAC CTA GGC AAA GGC TTC (Seq. Id. Nr. 1)

AS H L G K G F (Seq. Id. Nr. 2)

35 **SREBP-1-Exon 18c-Polymorphismus (SREBP-1- G1028G oder SREBP-1c-G1028G):**

NS G CAC CTA GGG AAA GGC TTC (Seq. Id. Nr. 3)

AS H L G K G F (Seq. Id. Nr. 4)

SREBP-2 (Wild-Typ):

NS CT GCT GCC GCC AAC CTA CA (Seq. Id. Nr. 5)
AS A A A A N L Q (Seq. Id. Nr. 6)

5 **SREBP-2-Exon 10-Polymorphismus (SREBP-2-A595G):**

NS CT GCT GCC GGC AAC CTA CA (Seq. Id. Nr. 7)
AS A A A G N L Q (Seq. Id. Nr. 8)

10 Analog wurde ein zwischenzeitlich im Rahmen einer Diplomarbeit veröffentlichter weiterer SREBP-2-Polymorphismus mit relativ grosser Häufigkeit ermittelt (siehe Diplomarbeit am Departement Forschung, Universitätskliniken Basel, von Patrick Y. Müller, "Sterol Regulatory Element Binding Protein 2: ..."), der in der Folge
15 als SREBP-2-Exon-6-Polymorphismus oder SREBP-2-R371K bezeichnet wird.

Eine Gegenüberstellung der Sequenz des Wild-Typs und dieses weiteren Polymorphismus zeigt eine Änderung auf Proteinstufe, nämlich Mutation eines Arginins
20 (R) zu einem Lysin (K) an Position 371 (R371K) in Exon 6, nämlich:

SREBP-2 (Wild-Typ):

NS CTG AGG AAG
25 AS L R K

SREBP-2-Exon 6-Polymorphismus (SREBP-2-R371K):

NS CTG AAG AAG
30 AS L K K

Wie aus den obigen Sequenzen ersichtlich ist, weist jeder der drei Polymorphismen eine geänderte Nukleinsäure im Exonbereich auf, wobei nur zwei der drei
35 Polymorphismen, nämlich jene zu SREBP-2, eine Mutation aufweisen, die sich auf Proteinebene auswirkt (siehe dazu Figur 1A, Figur 1B). Alle drei Polymorphismen führen je-

doch zu neuen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, nämlich im SREBP-1 zu einer für *Xmn* I und im SREBP-2 zu einer für *Msp* I resp. einer für *Dde* I.

- Selbstverständlich sind die entsprechenden
- 5 Polymorphismen auch in den Komplementärsträngen vorhanden, so dass im Rahmen der vorliegenden Erfindung überall, wo Bezug auf Nukleotidsequenzen gemacht wird, die entsprechende Offenbarung die Komplementärsequenzen einschliesst.
- 10 Da der Polymorphismus im SREBP-1-Gen nicht zu einer Änderung auf Proteinebene führt aber trotzdem mit dem Auftreten von Hypercholesterinämie korrelierbar ist, drängt sich der Schluss auf, dass dieser Polymorphismus mit einer oder mehreren Mutationen im selben Gen einher-
- 15 geht oder einen Einfluss auf der RNA-Ebene ausübt. Diese Annahme steht im Einklang mit der Tatsache, dass für den in SREBP-1 gefundenen Polymorphismus nicht nur ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Hypercholesterinämie gefunden wird, sondern gleichzeitig ein Zusammenhang mit einem
- 20 Mangel an Erhöhung der Gesamtcholesterin- und Triglycerid-Konzentration in HIV-Patienten nach der Verabreichung von Protease-Inhibitoren festgestellt wird. Dieser Polymorphismus ist deshalb ein wertvolles Hilfsmittel bei der Risikoabschätzung des Auftretens von unerwünschten Wir-
- 25 kungen und Einstellung einer Behandlung mit Protease-Hemmern.

- Eine andere wichtige Eigenschaft der vorliegend beschriebenen Polymorphismen, insbesondere des SREBP-2-A595G-Polymorphismus, ist dessen Vorherrschen bei
- 30 Patienten mit der Alzheimer-Krankheit im Vergleich zu dessen Vorkommen in der Bevölkerung allgemein, nämlich 7 % bei Alzheimer Patienten gegenüber 2.4 % in der Bevölkerung allgemein.

- Überraschenderweise wurde zudem gefunden,
- 35 dass alle drei oben näher beschriebenen Polymorphismen signifikanten Einfluss auf die Mortalität ihres Trägers haben.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass SREBP-2-A595G speziell geeignet ist um Aussagen über das Risiko für Cholesterinerhöhung an und für sich zu machen, währenddem SREBP-1c-G1028G insbesondere geeignet ist als prognostischer Marker für die individuelle Reaktion (Risiko der Cholesterinerhöhung) nach Gabe von Medikamenten. Für Aussagen über das Risiko für die Entwicklung der Alzheimer-Krankheit (auch unabhängig von einer gegebenenfalls assoziierten Cholesterinerhöhung oder -erniedrigung) ist SREBP-2-A595G bevorzugt, während für die Bestimmung des Risikos für die Entwicklung einer Erkrankung, die mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunden ist (auch unabhängig von einer gegebenenfalls assoziierten Cholesterinmodifikation oder Alzheimer-Krankheit) alle drei oben näher beschriebenen Polymorphismen geeignet sind, wobei SREBP-2-A595G und SREBP-1c-G1028G bevorzugt sind.

Während allgemein für das Verfahren Polymorphismen der SREBP geeignet sind, sind solche von SREBP-1 und/oder SREBP-2 bevorzugt, insbesondere aber Polymorphismen, die zu einer erhöhten oder erniedrigten Aktivierung von Genen im Lipidstoffwechsel, insbesondere im Cholesterinstoffwechsel führen. Dabei sind Polymorphismen, die zu erhöhter oder erniedrigter Plasmakonzentration mindestens eines Lipids, insbesondere von Cholesterin, führen weiter bevorzugt.

Es hat sich gezeigt, dass ein Polymorphismus, der eine Erkennungssequenz für eine innerhalb des Polymorphismus liegende Schnittstelle aufweist, sich speziell für ein Verfahren unter Verwendung dieser Erkennungssequenz eignet. Solche Erkennungssequenzen sind beispielsweise die Erkennungssequenz für *Xmn* I oder *Msp* I, d.h. GAANNNTTC oder CCGG, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann. Sequenzen, die solche Erkennungssequenzen enthalten sind beispielsweise

SREBP-1, Exon 18c:GCACCTAGGGAAAGGCTTC, (Seq. Id. Nr. 3) und

SREBP-2, Exon 10: CTGCTGCCGGCAACCTACA (Seq. Id. Nr. 7).

Diese Sequenzen können als solche oder zusammen mit weiteren Nukleotiden aus ihrer natürlichen Nachbarschaft als z.B. Sonde eingesetzt werden. Daneben gibt es aber auch weitere geeignete Sequenzen, wie die folgende Nukleinsäure-Sequenz, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleotiden aus der natürlichen Nachbarschaft dieser Sequenz, nämlich

10 SREBP-2, Exon 6: CTGAAGAAG.

Ein bevorzugtes Verfahren auf Ebene der Nukleinsäuren ist dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme und DNA-Extraktion mindestens ein Teilstück einer Sequenz, insbesondere eines Exons, eines SREBP, das einen Polymorphismus enthält, unter Verwendung zweier Oligonukleotidsequenzen amplifiziert wird, wobei der Polymorphismus charakteristisch ist für eine erhöhte oder erniedrigte Aktivierung von Genen im Lipidstoffwechsel insbesondere im Cholesterinstoffwechsel, und speziell bevorzugt für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholesterinämie beim Menschen, und dass das Produkt der Amplifikation einer Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder einer Denaturierung unterworfen wird und dass die Verdauungs- resp. Denaturierungsprodukte

25 elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Falls der Polymorphismus in einem Exon liegt ist vorzugsweise mindestens eine der Oligonukleotidsequenzen im Intronbereich angesiedelt, der dem Exon benachbart ist, in dem der Polymorphismus existiert, wie

30 beispielsweise die Paare

S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9):

5'-TTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und

S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10):

5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

35 **EcoR I.S1.18cF** (Seq. Id. Nr. 11):

5'- CGGAATTCTGAAATTATTATAATCTGGGTTTGTGTC -3' und

EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12):

5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAA ('G' 3-3' oder

S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13):

5'-GCCAGTGACCATTAAACACCTTTTGA-3' und

5 **S2.10P.R.** (Seq. Id. Nr. 14):

5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' oder

EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15):

5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAAACACCTTTTGA-3' und

EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16):

10 5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3'

EcoRI S2.6F (Seq. Id. Nr. 17):

5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTTCACTCATC-3'

EcoRI S2.6R (Seq. Id. Nr. 18):

5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3'.

15 Neben den oben angegebenen Sequenzen resp. Sequenzpaaren sind auch andere Sequenzen resp. Sequenzpaare verwendbar, wie mit den oben angegebenen Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierbare Sequenzen, einschliesslich Sequenzen ohne resp. mit anderen Erkennungssequenzen als der oben angegebenen EcoRI-Sequenz. Die Gesamtlänge solcher Sequenzen beträgt üblicherweise 15 bis 30 Basen.

Geeignete Polymorphismen können ermittelt werden durch amplifizieren und analysieren einer interessierenden SREBP-Sequenz, Vergleich der Exon-Bereiche dieser interessierenden Sequenz mit den Exon-Bereichen der Sequenz des in einer Population am häufigsten auftretenden Typs des entsprechenden SREBP und Untersuchung der Sequenzen mit gefundenen Unterschieden auf Fehlfunktion, wobei vorzugsweise die Unterschiede zu einer anderen Aminosäure und/oder insbesondere zu einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym führen. Eine solche Erkennungsstelle liegt vorzugsweise in einem Exon, sie kann aber auch in einem Intron liegen und beispielsweise zu einer Spleissvariante führen.

35 Der grosse Einfluss der gefundenen Polymorphismen auf Krankheitsbilder beeinflussende Faktoren wird

in der Folge kurz anhand der häufiger auftretenden Polymorphismen A595G und G1028G diskutiert:

Die A595G Mutation im SREBP-2 Gen ist mit einer signifikanten Modifikation der gemittelten Plasmacholesterin-Konzentrationen assoziiert. Die der publizierten cDNA Sequenz (12,15,16) entsprechende Aminosäurefolge wurde als Wildtyp definiert, obgleich - zumindest in dem vorliegend untersuchten Schweizer Bevölkerungskollektiv - die Sequenz, die Glycin an Position 595 kodiert, eine viel höhere Prävalenz hatte als das publizierte Alanin an dieser Stelle. Ueber 93% aller Individuen waren heterozygote oder homozygote Träger der A595G Mutation. Beide Gene wurden aus einer cDNA-Bibliothek, abgeleitet von HeLa Zellen, die vom Karzinom einer afro-amerikanischen Frau (Henriette Lacks) abstammen, sequenziert (17). Direkte Versuche mit HeLa Zellen zeigten Homozygotie hinsichtlich des nicht mutierten A595A Genotyps und legten die Annahme nahe, dass diese Person homozygote Trägerin des Wildtyp Allels war - ein Zustand, der jedoch nur bei 6.69% des schweizerischen Bevölkerungskollektivs vorgefunden wurde. Die Beobachtung einer hohen Prävalenz der A595G Mutation, führte im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Annahme, dass der seltene Wildtyp in homozygoter Form (11) mit einer höheren Plasmacholesterinkonzentration assoziiert sei, und die nicht mutierte Form (22) mit einer niedrigeren Konzentration, dass somit ein autosomal-rezessiver Effekt vorliegen könnte, weshalb die Allelkombinationen 11 und 12/22 miteinander verglichen wurden.

Das Kollektiv der eingeschlossenen Individuen war heterogen hinsichtlich der Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen, die von 1.95 bis 22.65 mmol/L reichten. Dieser grosse Bereich erklärte sich durch den Einschluss von zufälligen Stichproben, aber auch ausgewählten Kollektiven, und folglich normcholesterinämischen und hypercholesterinämischen Individuen. Daher war es nicht verwunderlich, dass ohne Stratifizierung des Kollektivs in zufällig/nicht zufällig ausgewählte oder in normcho-

lesterinämische/hypercholesterinämische Untergruppen, der Effekt zumindest eines der Polymorphismen, der des G1028G Polymorphismus, keine statistische Signifikanz erreichte ($P=0.0770$). Sobald jedoch diese Auswahlkriterien in die Berechnungen einbezogen wurden, war der Unterschied der G1028G Allelkombinationen 11/12 gegenüber 22 signifikant ($P=0.0164$). Ebenso verringerte sich bei der A595G Mutation die Wahrscheinlichkeit, dass Unterschiede in den Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen zwischen der Allelkombination 11 gegenüber 12/22 auf Zufall beruhten, von $P=0.0003$ (ungepaarter t-Test, keine Stratifizierung) auf $P<0.0001$ (Varianzanalyse = ANOVA, Stratifizierung).

Darüberhinaus waren bei beiden Polymorphismen die Assoziationen zwischen einer bestimmten Allelkombination und höheren Plasmacholesterin-Konzentrationen (Allelkombination 22 beim G1028G Polymorphismus, Allelkombination 11 beim A595G Polymorphismus; in Figur 3, E und F, schwarz dargestellt) in Anwesenheit des R158C ($\epsilon 2$ Phänotyp) Polymorphismus stärker und in Abwesenheit des C112R ($\epsilon 4$ Phänotyp) Polymorphismus im Apo E Gen schwächer. Es wurde gefunden, dass diese Gen-Gen Interaktionen die Assoziation des G1028G Polymorphismus (22 Allelkombination) mit höheren Plasmacholesterinkonzentrationen deutlich beeinflussen: nach Ausschluss der Träger der C112R Mutation war der Effekt der G1028G C \rightarrow G Mutation in homozygoter Form (22) hoch signifikant ($P=0.0002$).

Es konnte somit gezeigt werden, dass beide SREBP-Gene die Plasmacholesterin-Konzentrationen beim Menschen ähnlich den bekannten Effekten der beiden Polymorphismen im Apo E Gen (C112R und R158C), modifizieren. Desweiteren wurden Gen-Gen Interaktionen deutlich, wenn die SREBP-1 und -2 Genpolymorphismen mit den Polymorphismen im Apo E Gen korreliert wurden.

Bei 11.6% der Individuen mit sekundären Hyperlipoproteinämien waren die Plasma-triglyceridkonzentrationen erhöht. Ein Effekt erhöhter Triglyceridkonzentrationen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass,

wurden Individuen mit erhöhten Triglyceridkonzentrationen ausgeschlossen, die A595G Mutation eine signifikante Auswirkung auf männliche Individuen mit Diabetes mellitus zeigte ($P=0.0018$), dieser Effekt jedoch ausblieb, wenn
5 Individuen mit erhöhten Triglyceridkonzentrationen eingeschlossen wurden.

Die A595G Mutation im SREBP-2 Gen könnte sowohl eng mit einer anderen Mutation verbunden sein als auch die Spaltungsrate des Proteins direkt betreffen.
10 Exon 10, wo die A595G Mutation lokalisiert ist, gehört zwar nicht zum Teil des reifen Proteins, das in den Zellkern wandert. Trotzdem ist dieser Teil des Proteins insofern mit der Aktivität des Proteins verbunden, als er die Spaltungsvorgänge, die die SREBP-2 Vorläuferform aktivieren,
15 ren, beeinflusst.

Die Proteolyse wird durch ein Enzym eingeleitet, das eine hoch konservierte RXXL Sequenz der SREBP Vorläuferformen erkennt, welche in der hydrophilen Schleife lokalisiert ist. Durch einen ersten Proteolyse-
20 schritt werden die NH_2 -Terminus- und die COOH -Terminus-Domänen getrennt. Nach diesem ersten, Sterol-sensitiven Schritt wird das verbleibende, Membran-gebundene NH_2 -Terminus Fragment durch einen zweiten, Sterol-unabhängigen Schritt freigesetzt. Der zweite Proteolyseschnitt (site-
25 2) ist innerhalb der Membran-durchspannenden Region lokalisiert und wird durch das site-2 Enzym vermittelt. Der zweite Schritt erfolgt nur, wenn die site-1 Proteolyse stattgefunden hat. Eine Vorbedingung für die site-1 Proteolyse ist jedoch die Bildung eines Komplexes aus SREBP
30 und dem sogenannten SREBP Cleavage Activating Protein (SCAP). Bei Mangel von Sterolen in der Zelle bindet dieses Protein an die COOH -Terminus Domäne. Die Bildung des SREBP-SCAP Komplexes ist entscheidend für den site-1 Proteolyseschritt und abhängig von der Vollständigkeit der
35 COOH -Terminus Domänen von SREBP-2 und SCAP (18,19). Auf der Grundlage der vor kurzem von Sakai et al. (18) durchgeführten Experimente, der den COOH -Terminus Teil der

SREBP Vorläuferformen als regulatorische Einheit identifizierte, wirft die Mutation in dieser Domäne, die ein signifikantes Sinken der gemittelten Plasmacholesterinkonzentrationen verursacht, die Frage einer leicht vereinfachten Bildung des SREBP-SCAP Komplexes auf, wenn die A595G Mutation vorhanden ist.

Der Effekt des G1028G Polymorphismus scheint von den Gen-Gen Interaktionen mit dem Apo E Gen beeinflusst zu sein. Im Gegensatz zur G1028G Mutation im SREBP-1 Gen, hat die A595G Mutation im SREBP-2 Gen als Marker signifikante Auswirkungen auf die Plasmacholesterinkonzentrationen sowohl wenn das gesamte Kollektiv untersucht wird, als auch bei der Analyse der verschiedenen Untergruppen. Es ist wahrscheinlich, dass die Mutation ihre Wirkung zeigt, indem sie direkt den Spaltungsvorgang beeinflusst, der für die Sterol-abhängige Aktivierung von SREBP-2 verantwortlich ist.

Aus den obigen Ausführungen folgt, dass beide Gene die individuellen Plasmacholesterinkonzentrationen signifikant modifizieren. Obgleich viele Gene im intra- und extrazellulären Cholesterinstoffwechsel eine Rolle spielen, ist im Hinblick auf die Allgemeinbevölkerung bislang nur das Apo E Gen als modifizierendes Gen von grösserem Nutzen gewesen. Andere am Lipoproteinmetabolismus beteiligte Gene, wie etwa das LDL Rezeptorgen, das Apo B-100 Gen oder ein weiteres, unbekanntes Gen auf Chromosom 1p34.1-p32 könnten im mutierten Zustand deutliche Auswirkungen auf die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen haben. Jedoch sind diese Mutationen im Vergleich zu den Polymorphismen im Apo E- und den jetzt entdeckten Polymorphismen im SREBP-1 und SREBP-2 - Gen sehr selten. Selbst die R3'500Q Mutation, die mit einem von 209 betroffenen Individuen der Allgemeinbevölkerung (in der Schweiz) die höchste bisher beobachtete Prävalenz hat (2), tritt nicht häufig genug auf, um an diesem Polymorphismus den Einfluss eines bestimmten Gens auf den Chole-

sterin-stoffwechsel der Allgemeinbevölkerung zu untersuchen.

Die Verfahren und Polymorphismen der vorliegenden Erfindung sind somit sehr wertvolle Hilfsmittel
5 für die Früherkennung von Risikopatienten sowie für die Optimierung von Prophylaxe und Therapien. Ferner eignen sie sich als Targets für das Wirkstoffscreening, sowie die Beurteilung einer Therapie gegen eine Krankheit wie z.B. HIV. Der Wert der bevorzugten Polymorphismen dieser
10 Erfindung ist auch die Anwesenheit von Erkennungssequenzen in nächster Nähe des Polymorphismus. Diese Erkennungssequenzen sind in SREBP-1 die Erkennungssequenz für *Xmn* I, nämlich GAANNNTTC, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann, und in SREBP-2 die Erkennungssequenz
15 für *Msp* I, d.h. CCGG.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Erfassung von Risikoträgern sowie Hilfsmittel für dieses Verfahren, wie Oligonukleotid-Sequenzen zur Amplifizierung interessierender DNA-Abschnitte.

20 Ein bevorzugtes Verfahren zur Erfassung von Risikoträgern zeichnet sich aus durch die nachfolgend aufgeführten Schritte:

1. Blut- oder Gewebeentnahme
2. DNA-Extraktion
- 25 3. Amplifikation mit geeignetem Primer
4. Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder Denaturierung des PCR-Produktes
5. Elektrophoretische Auftrennung auf geeignetem Gel.
30

Über die Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen werden insbesondere die speziell interessierenden Polymorphismen nachgewiesen und über die Denaturierung (Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus = SSCP)
35 lassen sich daneben weitere Mutationen auffinden.

Eine bevorzugte Oligonukleotid-Sequenz zur Amplifizierung eines DNA-Abschnitts, der einem Exon-Bereich entspricht, in dem ein Polymorphismus existiert, ist dadurch gekennzeichnet, dass sie in einem Intronbereich angesiedelt ist, der dem Exon benachbart ist, in dem der Polymorphismus existiert und nahe der Exon/Intron Grenze liegt, oder im Exon selbst, sofern sich dadurch die Zahl der Schnittstellen vermindern lässt.

Bevorzugte Oligonukleotide für den SREBP-1 Polymorphismus sind die Oligonukleotide S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9): 5'-TTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' und S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10): 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3', die auch die Erfassung von Spleiss-Mutationen gestatten, sowie Oligonukleotiden, die daneben zusätzliche EcoR I-Schnittstellen besitzen, wie EcoR I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11): 5'-CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' und EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12): 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3'. Um Exon 10 des SREBP-2-Gens inklusive dessen Exon-/Intron-Grenzen zu amplifizieren sind die Oligonukleotide S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13): 5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und S2.10P.R (Seq. Id. Nr. 14): 5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' resp. EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15): 5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16): 5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3' bevorzugt.

Eine spezielle Verwendung von SREBP- Polymorphismen betrifft deren Einsatz auf sogenannten DNA- oder Gen-Chips. Verfahren unter Verwendung solcher Chips, die die gleichzeitige Erkennung verschiedener Gendefekte ermöglichen, sind in der Literatur beschrieben. So existiert Informationsmaterial der Firma Affymetrix zu deren GeneChip™ -Systemen, aber auch Artikel in Fachzeitschriften wie jene von Mark Chee et al., *Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays*, Science Vol. 274, Seiten 610-4, (1996) und David G. Wang, *Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide*

Polymorphisms in the Human Genome, Science Vol. 280, Seiten 1077-82, (1998).

Das Verfahren lässt sich kurz wie folgt zusammenfassen: Mittels Photolithographie werden gezielte Bereiche eines Wafers Schritt für Schritt der chemischen DNA- oder RNA-Einzelstrang-Synthese zugeführt, wobei der Schutzfilm nach jedem Syntheseschritt neu angebracht und anschliessend selektiv nur an denjenigen Stellen entfernt wird, an denen ein bestimmtes Nukleotid eingeführt werden soll. Durch dieses Vorgehen lassen sich Bereiche herstellen, die selektiv für bestimmte Polymorphismen sind. Zur Sichtbarmachung von Hybridisierungen mit Zielsequenzen können übliche Markierungen verwendet werden, z.B. licht-emittierende Markierung der in der Probe vorhandenen Fragmente, wie z.B. Biotinylierung und Detektion mit Streptavidin oder auch Fluoreszenzmarkierung.

Durch Entfernen markierter, nicht hybridisierender Fragmente werden Hybridisierungen auf dem Chip direkt oder nach einer weiteren Behandlung sichtbar. Selbstverständlich können die einzelnen Schritte dieses Verfahrens variiert werden, z.B. was den Zeitpunkt der Markierung oder die Art der Markierung anbelangt. Solche Variationen sind für den Fachmann erkennbar.

Ein Chip, der für die Früherkennung von Patienten mit einem erhöhten Risiko an Hypercholesterinämie geeignet ist weist neben den normalen SREBP-1- und SREBP-2-Sequenzen die entsprechenden Polymorphismen auf, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind. Neben diesen SREBP-1- und SREBP-2-Analysemitteln können selbstverständlich auch entsprechende Sequenzen für die weiteren Polymorphismen vorhanden sein, die für Hypercholesterinämie charakteristisch sind, d.h. FH, FDB und FDL.

Selbstverständlich kann ein entsprechender Chip auch zur Diagnose anderer Krankheiten bestimmt werden, die eine Abhängigkeit von SREBP-1 und/oder -2 zeigen, wie Alzheimer-Krankheit, oder er kann zur gleichzeitigen Diagnose mehrerer Krankheiten oder Risikofakto-

ren gestaltet werden, indem darauf für die interessierenden Krankheiten oder Risiken charakteristische Polymorphismen angebracht werden. Diesbezüglich interessante Sequenzen sind beispielsweise für das Studium kardiovaskulärer Risiken Sequenzen aus der folgenden Gruppe (bevorzugte Sequenzen unterstrichen):

- 11 β -Hydroxylase Aldosteron-Synthase Gen, 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD11K) Gen, 17 α -Hydroxylase (CYP17A) Gen, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG) Coenzym A Reduktase Gen, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG) Coenzym A Synthase Gen, Acyl Coenzym A:diacylglycerol acyltransferase Gen, Acyl-Coenzym A:cholesterol acyltransferase (ACAT)-1 Gen, Alpha-1-Antichymotrypsin Gen, Alpha-1-trypsin Gen, Alpha-Glaktosidase A Gen, Alpha-L-Iduronidase (IDUA) Gen, Alpha-Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) Gen, Alpha-Synuclein Gen, Angiotensin Gen, Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Gen, Angiotensin-converting Enzym Gen, Antitrypsin Gen, Apolipoprotein (a) Gen, Apolipoprotein AI-CIII-AIV Gen cluster, Apolipoprotein B-100 Gen, Apolipoprotein CI Gen, Apolipoprotein E (epsilon 2), Apolipoprotein E (epsilon 4), Apolipoprotein E Gen, Apolipoprotein E Rezeptor 2 Gen, Benzodiazepine Rezeptor Gen, CD-36 Gen, Cholesterol 24-Hydroxylase Gen, Cholesteryl ester transfer Protein (CETP) Gen, Cystathionin- β -Synthase Gen, Cystatin C Gen, Cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage Enzym Gen, Epithelialer Na⁺-Kanal (β -Untereinheit) Gen, Farnesyl-Pyrophosphate (PP) Synthase Gen, Fibrinogen Gen, Glucokinase Gen, GLUT1 Glukose Transporter Gen, Hepatische Lipase Gen, High density lipoprotein (HDL) Rezeptor Gen, Homogentisinsäure-Oxidase Gen, Hormone-sensitive Lipase Gen, Iduronat-2-Sulfatase Gen, Interleukin-8 Gen, Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) Gen, Lipoxygenase Gen, Lipoprotein Lipase Gen, Low density lipoprotein receptor-related Protein (LRP) Gen, Low density lipoprotein Rezeptor Gen, Lysosomale saure Lipase Gen, Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-A) Gen, Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-BI) Gen,

- Methylene-tetrahydrofolate Reduktase Gen, Microsomal triglyceride transfer Protein (MTP) Gen, NF- κ B Gen, Niemann-Pick C1 Protein Gen, Oxysterol binding Protein (OSBP) Gen, Paraoxonase-1 Gen, Paraoxonase-2 Gen, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha Gen,
 5 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta Gen, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma Gen, Plasminogen activator-inhibitor-1 Gen, Site-1 Protein (S1P) Gen, Site-2 Protein (S2P) Gen, Squalene
 10 Synthase Gen, SREBP cleavage-activating Protein (SCAP) Gen, Steroid acute regulatory Protein (StAR) Gen, Steroid-11 β -Hydroxylase (CYP11B1) Gen, Sterol-27-Hydroxylase Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c
 15 Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-2 Gen, Very low density lipoprotein (VLDL) Rezeptor Gen.

Für das Studium neurologischer Risiken ist beispielsweise ein Chip umfassend Sequenzen aus der nachfolgend aufgeführten Gruppe günstig (bevorzugte Sequenzen
 20 unterstrichen):

- A-beta precursor Gen, Adenosin monophosphate deaminase Gen, Alpha 2-monoglobulin Gen, Alpha-1-Antichymotrypsin Gen, Alpha-1-trypsin Gen, Alpha-2 Macroglobulin Gen, Alpha-ketoglyterate dehydrogenase Gen, Amyloid beta-protein precursor Gen, Amyloid precursor Protein Gen,
 25 Amyloid precursor-like Protein 1 Gen, Amyloid precursor-like Protein 2 Gen, Antitrypsin Gen, Apolipoprotein (a) Gen, Apolipoprotein AI-CIII-AIV Gen cluster, Apolipoprotein E (epsilon 2), Apolipoprotein E (epsilon 4), Apolipoprotein E Gen, Apolipoprotein E Rezeptor 2 Gen, Bcl-2 Gen,
 30 Beta-amyloid precursor Protein Gen, Beta-nerve growth factor Gen, Calbindin-D Gen, Captase Gen, Cathepsin D Gen, CD36 Gen, Clusterin Gen, Cyclooxygenase-2 Gen, Cystatin C Gen, Cytochrome C Oxidase 1 Gen, Cytochrome C
 35 Oxidase 2 Gen, Cytochrome Oxidase Gen, Dihydrofolate Reduktase Gen, Dihydrolipoylsuccinyltransferase (DLST) Gen, Endopeptidase 1 Gen, Estrogen-Bcl xL Gen, Fe65L2 Gen,

Gamma-synuclein Gen, Gelsolin Gen, GLUT1 Glukose Trans-
porter Gen, GLUT4 Glukose Transporter Gen, Glutaminsäure
Decarboxylase Gen, Glutation S-transferase Gen, HLA-A2
Gen, Interleukin-1 Gen, Interleukin-6 Gen, Interleukin-8
5 Gen, L-3-Hydroxyacyl-Coenzym A Dehydrogenase Gen, Li-
pooxygenase Gen, Low density lipoprotein receptor-related
Protein (LRP) Gen, Low density lipoprotein Rezeptor Gen,
Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-A) Gen, Makrophagen
Scavenger Rezeptor (SR-BI) Gen, Methylene-tetrahydrofo-
10 late Reduktase Gen, Myeloperoxidase Gen, NF- κ B Gen, Nie-
mann-Pick C1 Protein Gen, Non-A-beta component for amy-
loid (NAC) peptide Gen, Notch Gen, Ornithine transcar-
bamylase Gen, Presenilin 1 Gen, Presenilin 2 Gen, Prion
Protein Gen (PRNP) Gen, Prostaglandin E2 Gen, Serotonin
15 Gen, Serotonin Transporter Gen, Site-1 Protein (S1P) Gen,
Site-2 Protein (S2P) Gen, SREBP cleavage-activating Pro-
tein (SCAP) Gen, Sterol regulatory element-binding pro-
tein (SREBP)-1a Gen, Sterol regulatory element-binding
protein (SREBP)-1c Gen, Sterol regulatory element-binding
20 protein (SREBP)-2 Gen, Superoxid dismutase gene Gen, Tau
(Protein) Gen, Very low density lipoprotein (VLDL) Rezep-
tor Gen, X11alpha Protein Gen, X11L2 Gen.

Ferner sind die Polymorphismen, Verfahren und
Chips der vorliegenden Erfindung auch geeignet um alfäl-
25 lige Risikopatienten für die Behandlung mit speziellen
Medikamenten zu ermitteln, wie eine Behandlung mit Pro-
tease-Hemmern bei HIV-Infizierten.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von
Beispielen näher erläutert. Die Erfindung ist aber nicht
30 auf die im experimentellen Teil beschriebenen Beispiele,
resp. die darin explizit genannten Ausführungsformen, be-
schränkt.

Experimenteller Teil

Vorbemerkungen

5 Die Polymorphismen wurden ermittelt, indem Oligonukleotide zu Intronsequenzen im Exon/Intron-Grenzbereich synthetisiert wurden, so dass auch allfällige Spleissvarianten erfasst werden konnten. In der Folge wird das genaue Vorgehen bei der Detektion der vorliegend
10 relevanten Polymorphismen sowie deren Untersuchung im Detail beschrieben.

Probanden

15 Es wurden insgesamt 3'078 Personen in die Studie aufgenommen. DNA Polymorphismen und seltene Mutationen in fünf verschiedenen Genen wurden untersucht. In allen Personengruppen wurden Individuen mit TC Plasmakonzentrationen unter der 90. Percentile, standardisiert für
20 Alter und Geschlecht, als normocholesterinämisch (NC) bezeichnet; Individuen mit TC Plasmakonzentrationen über der 90. Percentile als hypercholesterinämisch (HC). 1'685 Probanden aus verschiedenen prospektiv untersuchten Zufallsstichproben wurden eingeschlossen. 630 Individuen
25 waren aus der "Swiss PREvalence for Apolipoprotein Defects" (SPREAD) Studie, einer grossen Querschnittsuntersuchung, die unverwandte, männliche Individuen aus den deutsch-, französisch- und romanischsprachigen Teilen der Schweiz einschloss, die für den Militärdienst rekrutiert
30 wurden. Weitere 324 Individuen wurden von der Interdisziplinären Altersstudie (IDA) eingeschlossen. Weitere 413 ältere Individuen wurden eingeschlossen, die aufgrund einer vermuteten Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktion untersucht wurden, aber nicht aufgrund einer Hypercholesterinämie. Diese Individuen aus der Basler Memory Clinic
35 (BMC) wurden als weiteres Kontrollkollektiv in die Studie aufgenommen. 318 betroffene und/oder nicht betroffene In-

dividuen wurden von der "Study to Investigate the Molecular Basis of Hypercholesterolemia in Switzerland in Hyperlipidemic Individuals by Pedigree Analysis" (SIBSHIP), einer Unterstudie des schweizerischen MED PED (Make Early
5 Diagnosis - Prevent Early Death)-Programms, eine multinationalen Studie unter der Schirmherrschaft der WHO, in die Studie aufgenommen. 871 Individuen wurden von Kollektiven mit vermuteten primären und sekundären Hyperlipoproteinämien eingeschlossen. Die molekulare Diagnose be-
10 ruhte auf der Identifikation der zugrundeliegenden Mutation (familiär-defektives Apo B (FDB), familiäre Dysbetalipoproteinämie (FDL), familiäre Hypercholesterinämie, molekular diagnostiziert (FHM) oder mittels Kosegregations-Analyse (FHM)). Die klinische Diagnose von familiären
15 Formen der Hypercholesterinämie beruhte auf Gesamt- und/oder LDL-Cholesterinwerten oberhalb der 90. Percentile und einer Familienanamnese mit mindestens zwei weiteren Familienmitgliedern mit Hypercholesterinämie. Individuen mit Familien mit diesen Merkmalen und Triglyzerid-
20 werten < 3.7 mmol/L und/oder Sehnenxanthomen wurden als familiäre Hypercholesterinämie, klinisch diagnostiziert, klassifiziert (FHC). Familien mit Individuen ohne Xanthome sowie Triglyzeridwerten ≥ 3.7 mmol/L wurden als familiär-kombinierte Hyperlipidämie (FCH) bezeichnet.
25 Insgesamt 298 Personen stammten aus der "Study on the molecular basis of Triggers Activating a Rise in Triglycerides and cholesterol in Endocrinological and Renal Diseases" (STARTER). Ein Kollektiv von 130 Personen mit biochemisch bestätigtem Diabetes mellitus (Nüchtern-
30 Plasma-Glukosewerte > 7.8 mmol/L) (DIA), 78 Individuen mit Hypothyreose und 14 Individuen mit Niereninsuffizienz (Kreatinin Clearance < 50 ml/min) (RIN) wurden in die Studie eingeschlossen. Bei allen Personen wurden mindestens Alter, Geschlecht und Gesamtcholesterinkonzentrationen
35 ohne lipidsenkende Behandlung und die klinische bzw. molekularbiologische Diagnose erfasst. Mit Ausnahme der SPREAD Studie wurden die Personen zusätzlich ausführlich

klinisch charakterisiert. In der IDA, BMC, SIBSHIP und STARTER Studie wurden Grösse, Gewicht, Body-Mass-Index, Blutdruck, das Vorhandensein oder Fehlen von klinischen Anzeichen der Hypercholesterinämie (Sehnenxanthome, Xanthelasmen und Arcus lipoides) und Zeichen und Symptome von koronarer Herzkrankheit, zerebrovaskulären Erkrankungen und peripher-arterieller Verschlusskrankheit, sowie biochemische Parameter wie Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride und Schilddrüsen-stimulierendes Hormon (TSH) bestimmt. Die Dokumentation beinhaltete auch die persönliche Anamnese einer koronaren Herzkrankheit, einer zerebrovaskulären Erkrankung, einer peripher-arteriellen Verschlusskrankheit, einer Schilddrüsenerkrankung, eines Diabetes mellitus, das Ausmass von Alkohol- und Zigarettenkonsum (in pack years) und, in den SIBSHIP- und STARTER-Studien, eine ausführliche Familiengeschichte mit zusätzlichen Lipoproteinanalysen (z.B. Lipoprotein (a) [Lp(a)], Apolipoprotein B etc.). Bei allen diesen Personen wurden die Proben für die weiteren Tests anonymisiert.

Material

25

Es wurden *Thermus aquaticus* DNA Polymerase und Desoxynukleotide von Perkin Elmer Cetus Corporation (Norwalk, CT, USA) und von Qiagen (Milden, Deutschland) verwendet. Die Restriktionsendonukleasen waren von New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA) und vorgefärbte Protein-Molekulargewichts-Marker und DNA-Molekulargewichts-Marker von Roche Diagnostics (Basel, Schweiz). Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Microsynth Inc. (Balgach, Schweiz) synthetisiert. Die DNA wurde in 200 µl Reaktionsgefässen mittels PCR Maschinen von Perkin Elmer (GeneAmp® PCR-System 9700) und Stratagene (RoboCycler® Gradient 96 temperature cycler, Stratagene,

La Jolla, CA, USA) amplifiziert. Es wurde Agarose von BioRad (Irvines, CA, USA) und Polyacrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid 37.5:1) von Oncor Inc. (Gaithersburg, MD, USA) verwendet. Vorgegossene GMATM Wide Mini S-50 Gele und Spreadex EL 300 Wide Mini S-100 Gele wurden von Elchrom Scientific (Cham, Schweiz) gekauft. Vorgegossene Gele für die Polyacrylamidgelelektrophorese (Ready Gels 10%) waren von BioRad. [α -³²P] dCTP und Hybond-C Extra-Nitrozellulose-Membranen waren von Amersham International (Buckinghamshire, UK). DH5 α Bakterien und lkb-DNA-Leitern waren von GIBCO BRL, Life Technologies (Paisley, UK); QIAmp 96 DNA blood-Kits, Genomic tip-Kits, QIAquick Extraktions- und PCR Purifikations-Kits, QIAprep Spin Miniprep-Kits und QIAGEN Plasmid Midi-Kits waren von Qiagen.

15

Methoden

Die in die Studie eingeschlossenen Individuen wurden für zwei bekannte DNA-Polymorphismen im Apolipoprotein E-Gen, die beide einen Aminosäureaustausch bewirken (C112R, R158C), eine in der Schweizer Bevölkerung mit hoher Prävalenz vorkommende DNA-Mutation im Apolipoprotein B-100 Gen, die einen Aminosäureaustausch (R3'500Q) verursacht, für einen neuen DNA-Polymorphismus im SREBP-1-Gen (G1028G), der zu keinem Aminosäureaustausch führt, und für einen neuen Polymorphismus im SREBP-2-Gen, der zu einem Aminosäureaustausch (A595G) führt, getestet. Eine Untergruppe dieser Personen, bei denen weitere Familienmitglieder mit Hypercholesterinämie untersucht wurden (SIPSHIP Studie), wurde auf das Vorhandensein von DNA-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen im LDL-Rezeptor-Gen untersucht, was die Durchführung von Kosegregationsstudien zur Bestätigung von LDL-Rezeptordefekten erlaubte. Individuen aus der SIPSHIP Studie wurden zusätzlich systematisch für Mutationen im LDLR-Gen getestet.

1. Lipoprotein Analysen

Nüchtern-Blutproben wurden von allen Personen, die in die Studie eingeschlossen wurden, abgenommen.

5 Lipid- und Lipoproteinanalysen wurden am Zentrallaboratorium der Universitätskliniken Basel durchgeführt, mit Ausnahme einer Untergruppe aus der SIPSHIP Studie mit familiären Formen von Hyperlipoproteinämien, die bei Studieneintritt bereits behandelt waren und bei denen eine

10 Auswaschperiode aufgrund ethischer Ueberlegungen nicht durchgeführt wurde. In dieser Untergruppe von Patienten wurden die Gesamtcholesterinkonzentrationen im Zentrallabor vor Beginn der medikamentösen Behandlung (pretreatment TC) bestimmt, oder die teilweise in anderen Labora-

15 torien bestimmten Gesamtcholesterinkonzentrationen vor Behandlung wurden von ihren behandelnden Hausärzten erfragt und in die Analyse aufgenommen. LDL-Cholesterin (LDLC) wurde mittels Heparin präzipitiert (Merck, Darmstadt, Deutschland) und mit Hilfe der Friedewald-Formel

20 errechnet. HDL-Cholesterin (HDL) wurde präzipitiert mittels Phosphor-Wolfram-Säure und Magnesium-Ionen (Roche Diagnostics). Gesamtcholesterin (TC), LDLC und HDLC Plasmakonzentrationen wurden mittels der enzymatischen kolorimetrischen Cholesterin 4-Aminophenazon (PAP) - Methode

25 von Roche Diagnostics auf einem Hitachi analyzer, Modell 737, gemessen.

2. DNA-Extraktionsmethode

30

Genomische Gesamt-DNA der in die Studie eingeschlossenen Personen wurde aus weissen Blutzellen mit Hilfe der Aussalzmethode(1), mit den früher beschriebenen Modifikationen(2), oder mittels der QIAmp™ 96 DNA blood-

35 Kits von Qiagen extrahiert.

3. Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus (SSCP)

a) Radioaktive Methode

5

Um LDL-Rezeptorgen-Mutationen nachzuweisen wurden alle 18 Exons des LDL-Rezeptor-Gens mittels der von Hobbs et al. (3) publizierten Oligonukleotide amplifiziert.

10

Zur Vervielfältigung von Exon 18c des SREBP-1-Gens inklusive der Exon-/Intron-Grenzen, um auch Spleiss-Mutationen zu entdecken, wurde das folgende Paar von Oligonukleotiden verwendet: S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9): 5'-TTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10): 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAGTTGTG-3'. Um Exon 10 des SREBP-2-Gens inklusive dessen Exon-/Intron-Grenzen zu amplifizieren wurden die Oligonukleotide EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15): 5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16): 5'-

CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3' verwendet. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 6 µl in 1x PCR Puffer (Perkin Elmer) unter Verwendung von 1.0 U Taq Polymerase (Qiagen), 74 kBq [α -³²P] dCTP (Amersham) mit einer Endkonzentration von 1.5 mM MgCl₂, 420 µM jeder der vier dNTP (Qiagen) und 8.3 µM jeder der beiden Oligonukleotide durchgeführt.

Für SSCP des LDL-Rezeptor-Gens wurde genomische DNA (200ng) unter den folgenden PCR Bedingungen amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 45 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 120 Sek. (29 Zyklen). Für SSCP der SREBP-1 und SREBP-2 Gene wurden 200ng genomischer DNA wie folgt PCR amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 60 Sek. (30 Zyklen). Anschliessend an die PCR wurden 25 µl Denaturierungs-Puffer (95 % Formamid, 0.05 % Bromphenolblau, 0.05 % Xylencyanol, 20 mM EDTA) der PCR Mischung zugegeben. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 95°C wurden 6 µl der Mischung auf

ein 7 % Polyacrylamidgel (Acrylamid: Bisacrylamid Mischung 37.5:1), 2x TBE, 1.37 M Glyzerol, Geldicke 0.75 mm) geladen und das Gel wurde in 1x TBE Puffer bei 4°C in einem Kühlraum oder bei Raumtemperatur bei 15-20 V/cm für
5 12-16 Stunden laufen gelassen. Danach wurde das Gel mit Hilfe eines Vakuumtrockners bei 80°C eine Stunde lang getrocknet und Kodak X-OMAT AR Filme wurden bei Raumtemperatur 3-36 Stunden belichtet.

10

b) Nicht-radioaktive Methode

Zur nicht-radioaktiven Identifizierung von Sequenzvariationen in Exon 10 des SREBP-2 Gens inklusive
15 seiner Exon-/Intron-Grenzen wurden die Oligonukleotide EcoR I S2.10F und Eco R I S2.10R verwendet. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 11 µl in 1x PCR Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 1.0 U Taq Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 1.5 mM MgCl₂, 909 µM jeder der
20 vier dNTP (Qiagen), und 4.6 µM jeder der beiden Oligonukleotide durchgeführt. Genomische DNA (100ng) wurde unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 58°C, 30 Sek; 72°C, 60 Sek. (29 Zyklen). Anschliessend an die PCR wurden 25 µl Denaturierungs- bzw. Lade-Puffer (97 % Formamid, 0.05 % Bromphenolblau; 0.05 % Xylencyanol, 10mM NaOH) der PCR Mischung zugegeben. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 92°C und sofortiger Abkühlung auf Eis für 10 Minuten wurden 6 µl der Mischung auf Elchrom GMA Wide Mini S-50 Gele geladen und
30 mit 1x TAE Puffer (Puffer Temperatur 9°C) bei 6 V/cm in einer Elchrom Sea 2000 Elektrophorese Kammer für 14 Stunden laufen gelassen. Nach Entfernung des Stützplastiks wurde das Gel 40 Minuten lang in 50 ml SYBR® Gold (Arbeitslösung nach Angaben des Herstellers Molecular Probes) in 0.75 x Standard TAE Puffer (4) auf einem Schüttler gefärbt. Nach 40-minütiger Entfärbung in 100 ml destilliertem Wasser auf einer Schüttelmaschine wurde das

Gel analysiert mittels 302 nm UV Durchleuchtung und unter Verwendung eines Gel Doc 1000 Systems von BioRad digitalisiert.

5

4. Sequenzierung von LDL-Rezeptor-Gen-Mutationen und SREBP-1, Exon 18c, und SREBP-2, Exon 10, - Mutationen

Die entdeckten Sequenzvariationen wurden weiter analysiert mittels Subklonierung amplifizierter Exone und anschliessender Sequenzierung des Inserts. Beim LDL-Rezeptor-Gen wurde die PCR-Amplifizierung der entsprechenden Exone mittels der oben beschriebenen Oligonukleotide durchgeführt (3). Im SREBP-1-Gen wurde die PCR-Amplifikation des Exon 18c mittels Oligonukleotiden, die zusätzliche *EcoR* I-Schnittstellen besaßen, durchgeführt; *EcoR* I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11): 5'-CGGAATTCTGAAATTATTATAATCTGGCTTTGTGTC-3' und *EcoR* I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12): 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3'. Im SREBP-2 Gen wurde die PCR Amplifikation des Exon 10 mittels *EcoR* I S2.10F: und *EcoR* I S2.10R: durchgeführt.

Die Amplifikationsreaktionen wurden in einem Endvolumen von 50 µl mit 1x PCR Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 2.5 U *Taq* Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 1.5 mM MgCl₂, 500 µM jeder der dNTP (Qiagen) und 2.0 µM jeder der beiden Oligonukleotide ausgeführt. Die folgenden Temperaturen wurden mittels eines Robocyclers erreicht: 95°C, 45 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 45 Sek. (30 Zyklen). Die amplifizierten Fragmente (50 µl) wurden auf ein 1 % Agarosegel, das 0.6 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, geladen, ausgeschnitten und mittels des QIAquick™ Extraktions-Kits (Qiagen) gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit 20 U *EcoR* I für mindestens 3 Stunden verdaut und mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purifikations-Kits gereinigt. Der Vektor pcDNA 3.1 His A (3-5 µg) wurde mit 40 U *EcoR* I für drei Stunden verdaut. Im Anschluss

5 daran wurden 20 U Kalb-Intestinal-Peptid (Roche Diagnostics) dazugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Vektor wurde mit dem QIAquick™ PCR Purifikations-Kit gereinigt und mit 50 µl Wasser eluiert. Die Ligation wurde
10 mittels des Ligations-Kits von Takara durchgeführt. Das gereinigte PCR Produkt (4 µl) und der gereinigte pcDNA3.1 His A Vektor (1 µl) wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers ligiert und in *E. Coli* DH5α Bakterien (Life Technologies) mittels der Hitzeschockmethode
15 (42°C für 45 Sek.) transformiert. Von Personen mit dem Wildtyp, gemäss den SSCP Resultaten, und von Personen mit der Sequenzvariation wurden 5-7 Kolonien ausgewählt und in 10 µl Wasser resuspendiert. Die Genotypisierung zur Festlegung des Vorhandenseins der Sequenzvariation wurde
20 mit 2 µl der Bakteriensuspension und SSCP-Methoden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Unabhängige Klone jeder der zwei Zustände (Wildtyp/Mutation) aus zwei unabhängigen PCR wurden sequenziert. Die DNA- Sequenzierung wurde durch die Microsynth AG durchgeführt mittels der Dideoxy-
25 Ketten-Terminations-Methode. Um die Klone zu expandieren wurden 5 µl der übriggebliebenen Suspension zu 3 ml LB Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von 1.5 ml der Bakteriensuspension wurde die Plasmid-DNA gereinigt unter Verwendung des QIAprep™ Spin Miniprep-Kits (Qiagen).

5. Test auf Apolipoprotein E-Mutationen, die die Plasmacholesterin-konzentration beeinflussen

30

Die beiden häufigen Apolipoprotein E Aminosäurepolymorphismen C112R und R158C wurden mittels PCR Amplifikation und anschliessender Verdauung mit *Hha* I bzw. des Isoschizomers *Cfo* I nach dem Protokoll von Hixson und Vernier (5) identifiziert.
35

6. Test auf Apolipoprotein B-Mutationen, die die Plasmacholesterin-konzentration beeinflussen

Drei unterschiedliche molekularbiologische Methoden wurden verwendet, um Mutationen zu suchen, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 3'500 des Apolipoprotein B-Gens führen. Proben von Personen aus der SREAD Studie (2) mit Gesamtcholesterinkonzentrationen ≤ 4.5 mmol/L wurden gepoolt (25 Proben) und mittels der Methoden von Ruzicka et al., 1992(6) und von Schuster et al.(7) auf Mutationen getestet. Personen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen > 4.5 mmol/L und positive Pools aus der SPREAD Studie, als auch alle anderen Proben, die bis 1996 untersucht wurden, wurden einzeln mittels allelspezifischer, asymmetrischer PCR, wie oben beschrieben (2), getestet. Von 1996 an wurde diese Methode durch eine site-directed Mutagenese-PCR-Technik, die eine *Msp* I Restriktionsschnittstelle bei Wildtypproben einführt, ersetzt. Die darauffolgende Verdauung mit *Msp* I(8) ermöglichte die Identifizierung von Patienten mit der R3'500Q Mutation.

7. Methoden zur Identifikation der SREBP-1, Exon 18c, und SREBP-2, Exon 10, -Polymorphismen mittels Restriktionsenzymverdauung

Im SREBP-1 Gen wurde das gesamte Exon 18c mittels des Primerpaars S1.18cF und S1.18cR amplifiziert; Exon 18c enthält den Polymorphismus, der eine variable *Xmn* I Schnittstelle generiert. Im SREBP-2 Gen wurde lediglich der 5' Teil des Exon 10 amplifiziert, der den Polymorphismus enthält, der eine variable *Msp* I Restriktionsschnittstelle generiert. Auf diese Weise wurde verhindert, dass weitere *Msp* I-Schnittstellen amplifiziert wurden, und ein komplexes Restriktionsmuster wurde vermieden. Beim SREBP-2 Gen wurden die folgenden Oligonu-

kleotide verwendet: S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13):5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und S2.10P.R (Seq. Id. Nr. 14):5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3'.

Zur Darstellung des SREBP-1-Polymorphismus

5 wurden 80 ng genomischer DNA von den untersuchten Personen unter den nachfolgenden PCR Bedingungen amplifiziert: 95°C, 240 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 55°C, 60 Sek.; 72°C, 90 Sek. (33 Zyklen). In einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden 2.0 µM von jedem der beiden Oligonukleotide,
10 400 µM jeder der dNTP (Qiagen), 1x PCR Puffer (1.5 mM MgCl₂ Endkonzentration, Perkin Elmer) und 0.6 U Taq Polymerase (Qiagen) gemischt. Vom nicht-gereinigten Amplikon wurden 20 µl in 1x NE Puffer mittels 16-32 U *Xmn* I (New England Laboratories), 0.2 µl 10mg/ml BSA und einer Inku-
15 bationstemperatur von 37°C für 5 Stunden verdaut.

Zur Darstellung des SREBP-2 Polymorphismus

wurden ca. 100 ng genomischer DNA mittels PCR unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C, 30 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 90 Sek. (30 Zyklen). In einem Gesamtvolumen
20 von 25 µl wurden 1.37 µM von jedem der beiden Oligonukleotide, 390 µM jeder der dNTP (Qiagen), 1x PCR Puffer (1.5 mM MgCl₂ Endkonzentration, Perkin Elmer) und 0.75 U Taq Polymerase (Qiagen) gemischt. Vom resultierenden Amplikon wurden 20 µl in 1x NE Puffer mittels 16 U *Msp* I
25 und einer Inkubationstemperatur von 37°C für 5 Stunden verdaut. Zur Identifikation der zwei Polymorphismen wurden 6-8 µl der verdauten Reaktionsgemische auf 10 % Polyacrylamid Ready Gele (BioRad) geladen und mit 1x TBE Puffer bei Raumtemperatur auf 18-22 V/cm für 25-35 Minuten
30 laufen gelassen. Die Gele wurden daraufhin in einer 50 ml 0.5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung für 5 Minuten gefärbt und mittels eines Gel Doc 1000 Systems von BioRad bei einer Wellenlänge von 302 nm UV Licht digitalisiert.

8. Untersuchung auf LDL-Rezeptor-Mutationen als Ursache für erhöhte Plasmacholesterin-Konzentrationen

Bei einer Untergruppe von 48 Personen wurde
5 die klinische Diagnose einer familiären Hypercholesterinämie aufgrund eines LDL-Rezeptor Defektes bestätigt
mittels Kosegregationsstudien unter Verwendung von 10
verschiedenen RFLP im LDL-Rezeptorgen (9,10). Bei 110 von
insgesamt 446 Familien wurden alle Exone des LDL-
10 Rezeptorgens mittels SSCP (radioaktive Methode) und der
publizierten Oligonukleotide (3) untersucht. Bei 22 Familien wurde das Vorhandensein von LDL-Rezeptor Mutationen
durch Subklonieren und Sequenzieren von Exonen, die Sequenzvariationen aufwiesen, bestätigt.

15

9. Statistische Analyse: Populationsgenetik

Die Daten des Geneva Survey, einer Studie bei
20 Schulkindern (13) und Daten aus der Swiss MONICA Studie
(3,341 Individuen eingeschlossen (14)), wurden verwendet,
um alters- und geschlechtsspezifische 90-er Perzentilen
für Gesamtcholesterin und Triglyzeride in der Schweiz zu
generieren. Alle Berechnungen wurden auf Mackintosh G3
25 Computern unter Verwendung der FileMaker® Datenbank
CARDIOFILE, der StatView® und SuperANOVA® Programme ausgeführt.

Individuen mit Plasmacholesterin-
Konzentrationen unter der 90-er Perzentile wurden als
30 normocholesterinämisch (NC) bezeichnet, Individuen mit
Gesamtcholesterin-konzentrationen über der 90-er Perzentile
als hypercholesterinämisch (HC). Bei beiden Gruppen
wurde der Einfluss des Vorhandenseins der Apo E Mutationen
C112R, R158C, und der neuen Aminosäurepolymorphismen
35 im SREBP-2 Gen (A595G) und im SREBP-1 Gen (G1028G) mit
Hilfe multivariater Testverfahren bestimmt.

10. Auswertung der nach obigen Angaben erhaltenen Resultate

5 10.1 Assoziation zwischen Polymorphismen in den SREBP-1 und -2 Genen mit Plasma- cholesterinkonzentrationen

10 10.1.1. Nachweis von Mutationen in den SREBP-1 and -2 Genen mit PIC-Werten über 0.25

Ein Personenkollektiv wurde auf das Vorhandensein von Sequenzvariationen mittels der Einzelstrang-Konformation-Polymorphismus-Methode (SSCP) untersucht. Ziel war der Nachweis von Polymorphismen, deren Vorkommen eine Häufigkeit erreicht, dass populationsgenetische Untersuchungen vorgenommen werden können. Dazu wurde ein Polymorphismusinformationsgehalt (PIC) - Wert von über 0.25 festgelegt. Die zwei durch die Einzelstrang-Konformation-Polymorphismus-Methode nachgewiesenen Sequenzvariationen, die eine im Exon 18c des SREBP-1 Gens und die andere im Exon 10 des SREBP-2 Gens, erfüllen diese Bedingung und wurden deshalb weitergehend charakterisiert. Exon 18c des SREBP-1 Gens und Exon 10 des SREBP-2 Gens von Personen, die die entsprechenden, vom Wildtyp abweichenden SSCP - Muster aufwiesen, wurden amplifiziert. Diese Exonsequenzen wurden subkloniert und sequenziert.

30 Figur 1A zeigt das Chromatogramm einer Person, die Träger eines DNA Polymorphismus an Aminosäureposition 1028 im Exon 18c des SREBP-1 Gens (G1028G) ist. Figur 1B zeigt das Chromatogramm einer Person, bei der ein DNA Polymorphismus, der zu einem Aminosäureaustausch an Position 595 im SREBP-2 Gen führt (A595G), nachgewiesen wurde.

Im SREBP-1 Gen fand sich eine Basensubstitution C → G im Exon 18c. Diese Basensubstitution führt nicht zu einem Aminosäureaustausch, generiert aber eine *Xmn* I Restriktionsschnittstelle (Figur 1A). Im SREBP-2 Gen wurde eine Basensubstitution C → G entdeckt. Diese Basensubstitution führt zu einem Austausch von Alanin zu Glycin in der Aminosäuresequenz und generiert eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle *Msp* I (Figur 1).

Die entsprechenden PIC - Werte, die aus allen eingeschlossenen Personen mit Ausnahme der verwandten Individuen aus der SIBSHIP Studie (N=2'446) errechnet wurden, betrugen 0.368 für den SREBP-1-Genpolymorphismus und 0.300 für den SREBP-2- Genpolymorphismus. Um grössere Kollektive hinsichtlich dieser Polymorphismen screenen zu können, wurde für jeden der beiden Polymorphismen eine Methode entwickelt, die auf einer PCR Amplifikation des entsprechenden DNA Abschnitts und darauffolgender Restriktionsenzymverdauung beruht (Figur 2). Weder der G1028G Polymorphismus noch der A595G Polymorphismus wichen signifikant vom Hardy - Weinberg Gleichgewicht ab ($P > 0.70$ bzw. $P > 0.10$, wenn ein rezessiver Effekt zugrunde gelegt wurde). Bei HeLa Zellen wurde der G1028G Polymorphismus nur auf einem der beiden Allele entdeckt (heterozygot hinsichtlich des G1028G Polymorphismus (12)). Die A595G Mutation konnte bei HeLa Zellen nicht nachgewiesen werden (homozygot hinsichtlich des A595A Polymorphismus (11)).

10.1.2. Populationsgenetik

Insgesamt wurden 3'078 Individuen untersucht; 2600 Individuen, bei denen Gesamtcholesterinwerte ohne Behandlung gemessen wurden, wurden hinsichtlich der Mutationen und Polymorphismen in vier Genen getestet. Eine Untergruppe von 954 Personen setzte sich aus Zufallsstichproben von Querschnittsuntersuchungen zusammen

(SPREAD, IDA), 318 waren nicht verwandte Individuen aus der SIBSHIP Studie (eine nicht betroffene Person pro Familie und alle Ehegatten, Schwager und Schwägerinnen, die genetisch unverwandt waren (REL)). Insgesamt 871 Personen wurden aus Patientenkollektiven mit primären und sekundären Hyperlipoproteinämien eingeschlossen. Alle 3'078 Individuen der Patienten- und Kontrollkollektive wurden auf das Vorhandensein der Mutation im Apo B-100 Gen, die zu einem Aminosäureaustausch bei Position 3'500 führt, getestet, um Patienten mit FDB in Kontrollkollektiven und den Patientenkollektiven mit Hyperlipoproteinämien zu identifizieren. Um Patienten mit familiärer Dysbetalipoproteinämie zu identifizieren, wurden alle 3'078 Individuen auf das Vorhandensein der Mutation im Apo E Gen bei Aminosäureposition 158 (E2 Allel) sowie auf das Vorhandensein der Mutation bei Position 112 (E4 Allel) untersucht. Das Vorhandensein von LDL-Rezeptor-Gendefekten führt generell zu einem signifikanten, d.h. zwei- oder dreifachen Anstieg der Gesamtcholesterinkonzentrationen, weshalb nur Patienten mit primären Formen von Hyperlipoproteinämien und deutlich erhöhten Gesamtcholesterinkonzentrationen auf das Vorhandensein dieser Mutationen hin untersucht wurden. Tabelle 1 zeigt eine Uebersicht über die verschiedenen Patienten- und Kontrollkollektive. Personen aus den Kontrollgruppen, die nachweislich unter bestimmten Störungen litten, die zu primären bzw. sekundären Formen von Hyperlipoproteinämie führen, wurden ebenfalls in die Patientenkollektive mit der entsprechenden Störung eingeschlossen. Somit ist die Summe der Personen aller Untergruppen grösser als die Anzahl der Individuen insgesamt (N=2'600). Tabelle 1 stratifiziert die Patienten- und Kontrollkollektive nach Individuen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen unterhalb der 90er Perzentile (normocholesterinämisch, NC) und Individuen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen oberhalb der 90er Perzentile (hypercholesterinämisch, HC).

Die in Tabelle 1 aufgeführten Patienten- und Kontrollkollektive wurden auf das Vorhandensein des beschriebenen Polymorphismus getestet mittels der oben erläuterten Methoden (Screenen von Personenkollektiven mit hohem Durchsatz).

Drei weitere Gene wurden untersucht: das Apo E Gen (Aminosäurepolymorphismen C112R und R158C), das Apo B-100 Gen (Mutation bei Aminosäureposition 3'500, R3'500Q). Im LDL-Rezeptor-Gen wurden Mutationen, die zu familiärer Hypercholesterinämie führen, mittels SSCP, darauffolgender Amplifikation der entsprechenden Exone, in denen Sequenzvariationen gefunden wurden, Subklonieren und Sequenzieren, identifiziert.

Insgesamt 3'078 Individuen wurden auf das Vorhandensein der Aminosäuresubstitution im Apo B Gen getestet (R3'500Q), sowie auf das Vorhandensein von zwei Aminosäurepolymorphismen im Apo E Gen (C112R oder E4 Allel, R158C oder E2 Allel), von denen bekannt ist, dass alle drei Mutationen die Plasmacholesterinkonzentration modifizieren.

Ausserdem sind 2'600 Personen hinsichtlich eines neuen DNA Polymorphismus im SREBP-1 Gen (G1028G) untersucht worden, der als Marker benutzt wurde. Alle 3'078 Personen wurden hinsichtlich eines neuen DNA Polymorphismus im SREBP-2 Gen (A595G) getestet, der zu einem Aminosäureaustausch führt.

Bei diesen Personen wurden die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen gemessen. Von den 3'078 eingeschlossenen Personen nahmen 478 lipidsenkende Medikamente bei Studieneintritt; Gesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung standen nicht zur Verfügung, weshalb diese Personen von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Von den übrigen 2'600 Personen wurden dann, wie beschrieben, Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung, standardisiert für ein Alter von 50 Jahren, in die weitergehende Analyse aufgenommen. Tabelle 2 fasst die Resultate der Prävalenz der beiden Po-

lymorphismen in den entsprechenden Untergruppen der Patienten- und Kontrollkollektive sowie die gemittelten Gesamtcholesterinkonzentrationen der verschiedenen Untergruppen im Verhältnis zum Vorhandensein des Polymorphismus zusammen.

Insgesamt zeigte sich ein hoch signifikanter, cholesterinsenkender Effekt der A595G Mutation im SREBP-2 Gen (Tabelle 2, N=2'600; P=0.0005). Dieser Effekt war noch ausgeprägter, falls die homozygoten Träger der C112R Mutation im Apo E Gen (E4/E4) (N=107) von der Untersuchung ausgeschlossen wurden (N=2'493; P<0.0001). Verwendete man nur genetisch unverwandte Personen für die Untersuchung, schloss also verwandte Personen aus der SIBSHIP Studie aus, sank die Wahrscheinlichkeit noch mehr, dass der Unterschied auf Zufall basierte (N=2'446, P=0.0003). Figur 3 zeigt die Analyse des Kollektivs unverwandter Personen (N=2'446), welches sich aus allen Individuen mit Ausnahme der genetisch verwandten aus der SIBSHIP Studie zusammensetzte, nach Stratifizierung hinsichtlich verschiedener Kriterien. Figur 3A and B veranschaulichen den Effekt der G1028G und A595G Polymorphismen bei zufällig ausgewählten Individuen. Zufallsstichproben (als solche festgelegt) hinsichtlich Hypercholesterinämie waren die SPREAD und IDA Studien sowie die Kollektive unverwandter, nicht betroffener Individuen (REL), und Personen, die aufgrund von möglichen Beeinträchtigungen der Gedächtnisfunktion (MCS) ausgewählt wurden. Aufgrund des Vorhandenseins einer Hypercholesterinämie wurden die restlichen Kollektive ausgewählt (nicht zufällig). Mittels Varianzanalysen (ANOVA, Scheffé Test) konnte ein signifikanter Effekt für den G1028G Polymorphismus nachgewiesen werden, wenn das Kollektiv hinsichtlich der Auswahlgruppe (zufällig/nicht zufällig) stratifiziert wurde (P=0.0164). Ebenso konnte der Effekt in beiden Gruppen bezüglich der A595G Mutation gezeigt werden; ANOVA ergab eine Wahrscheinlichkeit, dass der Unterschied auf Zufall basierte, von P<0.0001. Figuren 3C

und D zeigen die Stratifizierung hinsichtlich der 90er
Percentile (NC, HC). Beim G1028G Polymorphismus ergab
sich ein signifikanter Effekt unter Anwendung von ANCOVA
($P=0.0088$). Bei der A595G Mutation zeigte die Analyse
5 nach Berücksichtigung des zusätzlichen Faktors ebenfalls
eine Wahrscheinlichkeit von $P<0.0001$.

Ausserdem konnte der bekannte, cholesterinmo-
difizierende Effekt der Apo E Gen Polymorphismen C112R
($\epsilon 4$) und R158C ($\epsilon 2$) im getesteten Untersuchungskollektiv
10 gezeigt werden ($N=2'600$; $P<0.0001$).

Figuren 3, E und F, verdeutlichen die Gen -
Gen - Interaktionen zwischen Apo E und den SREBP-1 und -2
Genen. Wurden alle 2'600 Individuen in die Untersuchung
eingeschlossen, war kein signifikanter, cholesterinmodi-
15 fizierender Effekt des G1028G Polymorphismus im SREBP-1
Gen nachweisbar. Nach Einbeziehen der Effekte der Apo E
Gene in der Analyse, war für den G1028G Polymorphismus
der Unterschied zwischen der homozygoten Form des Poly-
morphismus (22) und den anderen zwei Allelen (11/12)
20 nicht signifikant (ANOVA, $P=0.0722$). Wurden jedoch homo-
zygote oder heterozygote Träger der Apo E C112R ($\epsilon 4$) Mu-
tation ausgeschlossen ($N=761$), war der Effekt des Fehlens
des Wildtyp - Allels auf die Plasmagesamtcholesterinkon-
zentrationen hoch signifikant ($N=1'839$; $P<0.0001$). Beim
25 A595G Polymorphismus war der Unterschied zwischen der ho-
mozygoten Form des Wildtyp (11) und der anderen beiden
Allele (12/22) schon hoch signifikant ($P=0.0002$) nach
Einbeziehen der Effekte der Apo E Gene in die Analyse.
Wenn homozygote oder heterozygote Träger der Apo E C112R
30 ($\epsilon 4$) Mutation ausgeschlossen wurden, sank die Wahrschein-
lichkeit eines auf Zufall beruhenden Effekts weiter
($P<0.0001$).

Eine weitere Stratifizierung der Kollektive
hinsichtlich der zugrunde liegenden Störungen, die entwe-
35 der eine primäre oder sekundäre Hypercholesterinämie ver-
ursachen, ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Resultate der
Häufigkeitsberechnungen der beiden Polymorphismen

(G1028G, A595G) entsprechend den verschiedenen Untergruppen finden sich in der ersten Zeile. Die Ergebnisse der gemittelten Gesamtcholesterinwerte ohne Behandlung in den verschiedenen Untergruppen, stratifiziert bezüglich des Vorhandenseins oder Fehlens der G1028G und A595G Polymorphismen, werden in der zweiten Zeile gezeigt (Tabelle 2). In den Untergruppen mit primären Hyperlipidämien hatte der Effekt der A595G Mutation statistische Relevanz in der Patientengruppe mit FDL ($P=0.0020$) und in der Patientengruppe mit primärer Hypercholesterinämie (PHC). Bei diesen Patienten waren Mutationen in den Apo E, Apo B und LDL Rezeptor Genen ausgeschlossen worden, obgleich ein autosomal-dominant oder -rezessiv vererbter Gendefekt als Ursache für Hypercholesterinämie vermutet wurde. In dem letztgenannten Kollektiv war die Prävalenz des Wildtyp (11) Allels signifikant höher (9.38%) als in der Summe der anderen Kollektive (6.69%) ($P=0.0328$).

Hinsichtlich der Kollektive mit sekundären Hyperlipoproteinämien (hierzu gehören sowohl als NC als auch als HC klassifizierte Personen), konnte bei Männern mit Diabetes mellitus und normalen Plasmatriglyceridkonzentrationen ($TG < 2.3 \text{ mmol/L}$) ein signifikanter Unterschied zwischen A595A (11) und A595G (12/22) positiven Individuen festgestellt werden ($P=0.0018$). Bei 11.6% der Individuen mit sekundären Hyperlipoproteinämien waren die Plasmatriglyceridkonzentrationen erhöht.

Im SREBP-1 Gen betrug die Prävalenz des Wildtyp Allels im homozygoten Zustand (11) 40.35%, die Prävalenz des G1028G Polymorphismus im heterozygoten Zustand (12) 45.62% und im homozygoten Zustand (22) 14.04% ($N=2'600$). Im SREBP-2 Gen war die Prävalenz des Wildtyps im homozygoten Zustand (11) 6.69%, die Prävalenz der A595G Mutation im heterozygoten Zustand (12) 35.15% und im homozygoten Zustand (22) 58.15% ($N=2'600$).

Um den Effekt der entdeckten DNA- und Aminosäurepolymorphismen auf die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen zu erklären, wurden 3'078 Individuen moleku-

largetenetisch untersucht. Bei 2'600 Personen konnten sowohl demographische als auch klinische Daten ergänzt werden mit Angaben zu Alter, Geschlecht, Gesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung mit lipidsenkenden Medikamenten zum Zeitpunkt der Cholesterinbestimmung, Genotyp hinsichtlich des Apo E Aminosäurepolymorphismus (C112R oder ϵ 4 Allel, R158C oder ϵ 2 Allel), und zur Apo B100 Mutation, die zuerst als ursächlich für FDB (R3'500Q) entdeckt wurde. Der R158C Aminosäurepolymorphismus hat im homozygoten Zustand einen cholesterinmodifizierenden Effekt in der untersuchten Population ($P < 0.0001$). Bei Personen, die Träger der R3'500Q Mutation (FDB) sind, waren die Gesamtcholesterinkonzentrationen erhöht im Vergleich zu Personen ohne Apo B Defekt ($P < 0.0001$). Bei Personen mit nachgewiesenen LDL Rezeptor Mutationen (FHM) waren die gemittelten Gesamtcholesterinkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ($P < 0.0001$). Insgesamt beeinflusst der im SREBP-1 Gen entdeckte DNA Polymorphismus (G1028G) die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen bei dieser Personengruppe nicht signifikant. In Kombination mit dem Vorhandensein der Apo B R3'500Q Mutation war der G1028G (22) Polymorphismus jedoch signifikant mit einem Anstieg der Plasmacholesterin-Konzentrationen assoziiert ($P = 0.0097$). Eine weitergehende Stratifizierung der an der Studie beteiligten Personen entsprechend der zugrunde liegenden genetischen Störungen oder der klinischen Diagnose bestätigte den Effekt des neuen SREBP-2 Aminosäurepolymorphismus auf Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen bei fast allen Gruppen, aber keiner der Unterschiede erreichte statistische Signifikanz ausser bei der Patientengruppe mit familiärer Dysbetalipoproteinämie, FDL, und bei Personen, die an Hypercholesterinämie aufgrund unbekannter Gendefekte leiden (PHC).

35

10.2. Assoziation der A595G Mutation mit seniler Demenz vom Alzheimer Typ

Ein anderes bemerkenswertes Resultat der vorliegenden Studie ist die signifikante Differenz der Prävalenz des Wild-Typ Allels (A595A) verglichen mit der Aminosäuresubstitution (A595G), beim Vergleich eines klinisch diagnostizierten Alzheimerpatientenkollektivs mit der Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung (Tabelle 2, 2.4% versus 7.0%; $P = 0.0234$).

10

10.3. Assoziation des G1028G Polymorphismus mit einem fehlenden Anstieg der Plasmalipid-Konzentration nach Gabe von Proteasehemmer bei HIV-Patienten

15

Die Resultate betreffend Prävalenzunterschiede sind ebenfalls in Tabelle 2 dargestellt ($P = 0.0339$). Figur 4 zeigt die prozentuale Änderung der Plasmacholesterinspiegel vor und nach Gabe von Proteasehemmern in Abhängigkeit vom G1028G Polymorphismus.

20

11. Studie umfassend den Polymorphismus in Exon 6 von SREBP-2

25

11.1. Grundlagen

Probanden

Es wurden insgesamt 1'081 Probanden aus denselben Gruppen wie bereits oben ausgeführt (711 aus der SPREAD Studie, 346 aus der IDA-Studie sowie 24 aus einem prospektiv untersuchten Kollektiv von in Basel Verstorbenen (PATH-Studie)) in diese Untersuchung aufgenommen.

30

Material

Neben den bereits beschriebenen Materialien wurde zusätzlich das Restriktionsenzym *Dde* I (New England Biolabs) verwendet.

35

Methoden

Die in die Studie eingeschlossenen Probanden wurden zusätzlich für eine weitere Mutation im SREBP-2-Gen (Exon 6), die zu einem Aminosäureaustausch (R371K) führt, getestet.

Die SREBP-2 R371K Mutation wurde im wesentlichen wie bereits beschrieben untersucht. Insbesondere wurde für die Lipoprotein Analysen, die DNS-Extraktionsmethode sowie für die Bestimmung des Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus (SSCP) nach der nicht-radioaktive Methode wie oben beschrieben vorgegangen.

11.2. Sequenzierung der SREBP-2, Exon 6-Mutation

Diese wurde wie bereits beschrieben durchgeführt, mit den folgenden Modifikationen: Im SREBP-2 Gen wurde die PCR-Amplifikation des Exons 6 mittels der Oligonukleotide *EcoR* I.S2.6F (Seq. Id. Nr. 17): 5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTTCACTCATC-3' und *EcoR* I.S2.6R (Seq. Id. Nr. 18): 5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3' durchgeführt. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem Endvolumen von 50 µl mit 1x Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 0.4 U *Taq* Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 3.5 mM MgCl₂, 455 µM jeder der dNTP (Qiagen) und 2.0 µM jeder der beiden Oligonukleotide bei den folgenden Temperaturen ausgeführt: 94°C (45"); 56°C (30"); 72°C (1'); 32 Zyklen. Die amplifizierte Fragmente wurden mittels Subklonierung und anschließender Sequenzierung des Inserts (wie bereits beschrieben) analysiert.

11.3. Methoden zur Identifikation der SREBP-2, Exon 6-Mutation mittels Restriktionsenzymverdauung

Zur Darstellung der SREBP-2-Mutation (Exon 6, R371K) wurden ca. 100 ng genomischer DNS mittels der be-

reits oben beschriebenen Methoden unter Verwendung der Oligonukleotide *EcoR* I.S2.6F und *EcoR* I.S2.6R amplifiziert. 20µl wurden in 1x NE Puffer mittels 7 U *Dde* I und einer Inkubationstemperatur von 37°C für 5 Stunden verdaut. Zu dem verdauten Reaktionsgemisch wurden 4µl 5x nicht-denaturierender Ladepuffer (Elchrom) dazugegeben. 7µl dieser Mischung wurden auf Spreadex Wide-Mini S-100 Gele (Elchrom) geladen, bei 55°C auf 10V/cm für 25-45 Minuten laufen gelassen, mit Ethidiumbromid gefärbt (40 Minuten), entfärbt mit destilliertem Wasser (40 Minuten), und mittels eines Gel Doc 1000 Systems digitalisiert.

11.4. Statistische Methoden

Zum Vergleich der Prävalenzen von Sequenzvariationen in den SREBP-1 und -2 Genen wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt.

11.5. Auswertung der nach obigen Angaben erhaltenen Resultate

Der Altersmedian bei den 698 Probanden der SPREAD-Studie betrug 20.5 Jahre (Altersbereich 18.8 - 43.7 Jahre), der Altersmedian bei den 370 Probanden der IDA-Studie 74.5 Jahre (Altersbereich 47.0 - 95.4 Jahre). Der Vergleich der zwei Gruppen von Probanden, die nicht selektioniert, aber unterschiedlichen Alters waren, zeigte statistisch signifikante Unterschiede im Vorhandensein von SREBP-1 und SREBP-2 Mutationen.

Die Prävalenz des Fehlens des SREBP-1c-G1028G Polymorphismus in homozygoter Form (d.h. Genotyp 11/12) bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 622/711 (87.5 %) gegenüber nurmehr 304/367 (82.8%) bei den Probanden der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von absolut -4.7% (bzw. relativ -5.4%) mit einem P-Wert von 0.038 (Chi-Quadrat Test).

Die Prävalenz des Fehlens des SREBP-2 A595G Polymorphismus in homozygoter Form (d.h. Genotyp 11/12) bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 305/711

(43.0%) gegenüber nurmehr 135/370 (36.5%) bei den Probanden der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von absolut -6.8% (bzw. relativ -15.1%) mit einem P-Wert von 0.041.

5 Die Prävalenz der SREBP-2 R371K Mutation bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 19/698 (2.7%) gegenüber nurmehr 3/370 (0.8%) bei den Probanden der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von absolut -1.9 (bzw. relativ -70.4%) mit einem P-Wert von
10 0.036.

11.6. Diskussion

Die Unterschiede in den Prävalenzen in den Gruppen von jüngeren bzw. älteren Probanden können nur
15 durch Unterschiede in der Mortalität erklärt werden, da beide Stichproben aus derselben Bevölkerung gezogen wurden.

Bei der IDA/PATH-Studienpopulation mit einem Altersmedian von 74.5 Jahren sind demnach bereits zahlreiche Probanden verstorben, die Träger des SREBP-2 G1'028G Genotyps 11/12 sind: 316 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 304 Probanden wurden mit diesem Genotyp (11/12) beobachtet, 12 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

25 Dasselbe gilt für die Träger des SREBP-2 A595G Genotyps 11/12: 159 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 135 Probanden wurden mit diesem Genotyp (11/12) beobachtet, 24 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

30 Ebenfalls gilt dies für die selteneren Träger der SREBP-2 R371K-Mutation: 10 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 3 Probanden wurden mit dieser Mutation beobachtet, 7 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

35 Eine Erklärung für die signifikant niedrigere Prävalenz bestimmter Sequenzvariationen in SREBP-1 und SREBP-2 ist die erhöhte Mortalität bei Trägern der Geno-

typen SREBP-1.18c (11/12), SREBP-2.10 (11/12) und den Trägern der SREBP-2 R371K Mutation. Dies kann beispielsweise durch die bereits beschriebene Assoziation zur Erhöhung des Plasmacholesterinspiegels mit der Folge einer

5 koronaren Herzkrankheit bedingt sein, aber auch durch das überproportionale Auftreten von Krankheiten, wie beispielsweise der senilen Demenz vom Alzheimer Typ, wie ebenfalls bereits beschrieben, durch die beiden genannten oder durch Kombinationen mit weiteren Risikofaktoren.

Tabelle 1

Kollektiv	Studien	Beschreibung des Kollektivs	Alter	Geschlecht	Alle Individuen		Normcholesterinämische Individuen ¹⁾		Hypercholesterinämische Individuen ¹⁾				
					Mittelwert	m / (m+w)	A	TC	A	TC	A	TC	
							Mittelwert (±1SD)		Mittelwert (±1SD)		Mittelwert (±1SD)		
Alle Individuen													
TTL	SPREAD, SIBSHIP IDA, MCS, STARTER	Alle Altersgruppen	45.55	0.66	2'600	6.84	±2.52	1'980	5.80	±1.32	620	10.14	±2.58
Kollektive zufällig ausgewählter Individuen													
RDM.YNG	SPREAD	Zufallsstichprobe (jung)	20.77	1.00	630	5.12	±0.88	612	5.05	±0.78	18	7.40	±1.17
RDM.ELD	IDA	Zufallsstichprobe (ä lter)	75.98	0.67	324	6.46	±1.49	316	6.39	±1.45	8	8.93	±1.01
Kollektive von Individuen mit Störungen, die primäre Hyperlipoproteinämien verursachen													
FDL	SPREAD, SIBSHIP IDA, MCS, STARTER	Apolipoprotein E Defekt (R158C, homozygot)	46.17	0.76	46	9.90	±4.10	15	5.27	±1.43	31	12.15	±2.89
FDB	SPREAD, SIBSHIP IDA, MCS, STARTER	Apolipoprotein B Defekt (R3'500Q, heterozygot)	41.49	0.54	37	9.046	±1.341	5	6.93	±0.86	32	9.38	±1.08
FHM	SIBSHIP	LDLR Defekt (molekular-genet. nachgewiesen)	34.87	0.51	74	10.93	±2.43				74	10.93	±2.43
PHC	SIBSHIP	Primäre, isolierte Hypercholesteriämie ²⁾	40.58	0.55	341	9.90	±2.62	-	-	-	341	9.90	±2.62
PCH	SIBSHIP	Primäre, kombinierte Hyperlipoproteinämie ²⁾	47.48	0.82	85	9.98	±2.22	-	-	-	85	9.98	±2.22
REL	SIBSHIP	Verwandte, nicht betroffen ³⁾	40.19	0.54	318	6.39	±1.19	310	6.35	±1.17	8	8.11	±0.34

Kollektive von Individuen mit Störungen, die sekundäre Hyperlipoproteinämien verursachen⁴

DIA	STARTER, SIBSHIP IDA, MCS	Diabetes mellitus (GlucosePlasma >7.8mmol/L)	50.96	0.59	229	6.48	±1.97	191	5.87	±1.21	38	9.55	±2.20 → SHL
RIN	STARTER, SIBSHIP IDA, MCS	Niereninsuffizienz (Klärung < 50ml/min.))	76.63	0.44	131	7.17	±2.68	115	6.83	±2.58	16	9.65	±2.07 → SHL
LIV	STARTER, SIBSHIP IDA, MCS	Alkoholkonsum >60g/T und/oder γ -GT >664/l	53.32	0.85	151	8.22	±2.89	86	6.49	±1.25	65	10.52	±2.84 → SHL
HTH	STARTER, SIBSHIP IDA, MCS	Schilddrüsenunterfunktion (TSH > 4.0mIU/L)	59.53	0.15	102	6.54	±1.97	86	5.92	±1.02	16	9.86	±2.49 → SHL

Kollektive von Individuen mit Störungen, die möglicherweise mit SREBP-1 und/oder -2- in Zusammenhang stehen

MEM.TTL	MCS	Erwachsene (alle Altersgruppen)	70.63	0.46	413	6.24	±1.67	387	6.09	±1.61	26	8.39	±0.93
MEM.DAT		Demenz vom Alzheimer Typ (MM'S < 26)	73.50	41.2	165	6.16	±1.31	157	6.06	±1.25	8	8.17	±0.61
HIV.STB	STARTER	TC, nicht ansteigend unter Proteaseinhibitoren ⁵⁾	34.24	80.0	25	4.79	±1.31	24	4.70	±1.25	1	7.05	
HIV.INC		TC, ansteigend unter Protease Inhibitoren ⁵⁾	38.06	85.0	20	4.52	±0.91	20	4.52	±0.91			

¹⁾ Normcholesterinämisch: Plasmacholesterin < 90er Perzentile, entsprechend Alter und Geschlecht; hypercholesterinämisch: Plasmacholesterin > 90er Perzentile, entsprechend Alter und Geschlecht

²⁾ Zugrunde liegende molekulare Defekte unbekannt

³⁾ Nur unverwandte Individuen (eine nicht betroffene Person pro Familie und alle Ehegatten, Schwager und Schwägerinnen genetisch unverwandt)

⁴⁾ Kombinierte Kollektive aus Individuen, die aufgrund von sekundären Hyperlipoproteinämien ausgewählt wurden, und Individuen aus anderen Kollektiven

⁵⁾ HIV positive Individuen, bei denen die Plasmasamtcholesterinkonzentrationen nicht (STB) oder nach Verabreichung von Proteaseinhibitoren ansteigen (INC)

Tabelle 2

Kollektiv	SREBP-1 Polymorphismus (G1028G)						SREBP-2 Polymorphismus (A595G)					
	11		12		22		11		12		22	
	Prävalenz ¹⁾ TC Mittelwert ²⁾	P	ΔTC ³⁾	P	ΔTC ³⁾	P	ΔTC ³⁾	P	ΔTC ³⁾	P	ΔTC ³⁾	P
Alle Individuen												
TTL	PR 40.35 (1'049)	45.62 (1'186)	14.04 (365)	-	-	-	6.69 (174)	35.15 (914)	58.15 (1'512)	-	-	-
	TC 6.74 ±2.47	6.88 ±2.53	6.99 ±2.61	0.2309	0.2309	0.2309	7.47 ±3.48	6.83 ±2.57	6.77 ±2.34	0.0005	0.0005	0.0005
Kollektive zufällig ausgewählter Individuen												
RDM.YNG	PR 41.75 (263)	45.71 (288)	12.54 (79)	0.3270	0.3270	0.3270	5.87 (37)	36.51 (230)	57.62 (363)	0.3445	0.3445	0.3445
	TC 5.04 ±0.87	5.15 ±0.90	5.24 ±0.87	0.1735	0.1735	0.1735	5.15 ±0.85	5.06 ±0.91	5.15 ±0.87	0.7943	0.7943	0.7943
RDM.ELD	PR 41.36 (134)	40.74 (132)	17.90 (58)	0.0324	0.0324	0.0324	5.56 (18)	30.25 (98)	64.20 (208)	0.3815	0.3815	0.3815
	TC 6.50 ±1.55	6.41 ±1.41	6.36 ±1.53	0.5796	0.5796	0.5796	6.77 ±1.51	6.55 ±1.66	6.39 ±1.40	0.3525	0.3525	0.3525
Kollektive von Individuen mit Störungen, die primäre Hyperlipoproteinämien verursachen												
FDL	PR 32.26 (10)	41.94 (13)	25.81 (8)	0.0578	0.0578	0.0578	9.68 (3)	16.13 (5)	74.19 (23)	0.5034	0.5034	0.5034
	TC 12.63 ±2.78	11.54 ±3.37	12.96 ±2.15	0.4351	0.4351	0.4351	16.89 ±3.45	10.62 ±1.76	12.01 ±2.47	0.0020	0.0020	0.0020
FDB	PR 33.33 (12)	38.89 (14)	16.67 (6)	0.4401	0.4401	0.4401	8.33 (3)	44.44 (16)	36.11 (13)	0.5412	0.5412	0.5412
	TC 9.99 ±0.98	9.06 ±1.12	8.92 ±0.68	0.2393	0.2393	0.2393	8.63 ±0.22	9.21 ±1.09	9.77 ±1.01	0.1989	0.1989	0.1989
FHM	PR 33.78 (25)	48.65 (36)	17.57 (13)	0.3753	0.3753	0.3753	8.11 (6)	35.14 (26)	56.76 (42)	0.6210	0.6210	0.6210
	TC 11.55 ±1.98	10.56 ±2.09	10.74 ±3.58	0.7579	0.7579	0.7579	11.15 ±2.34	11.06 ±2.13	10.81 ±2.59	0.8118	0.8118	0.8118
PHC	PR 38.12 (130)	48.09 (164)	13.78 (47)	0.8842	0.8842	0.8842	9.38 (32)	37.24 (127)	53.37 (197)	0.0328	0.0328	0.0328
	TC 9.74 ±2.31	10.04 ±2.97	9.85 ±2.06	0.8737	0.8737	0.8737	10.89 ±4.82	9.90 ±2.20	9.72 ±2.20	0.0240	0.0240	0.0240
PCH	PR 41.18 (35)	43.53 (37)	15.29 (13)	0.7347	0.7347	0.7347	10.59 (9)	36.47 (31)	52.01 (41)	0.1439	0.1439	0.1439
	TC 9.97 ±2.46	9.81 ±1.82	10.50 ±2.69	0.3650	0.3650	0.3650	9.71 ±2.23	10.35 ±2.98	9.73 ±1.53	0.7019	0.7019	0.7019
REL	PR 39.62 (126)	46.86 (149)	13.52 (43)	0.7772	0.7772	0.7772	6.60 (21)	33.33 (106)	60.06 (191)	0.0462	0.0462	0.0462
	TC 6.38 ±1.15	6.44 ±1.09	6.27 ±1.55	0.4679	0.4679	0.4679	6.43 ±1.10	6.33 ±1.26	6.32 ±1.16	0.9984	0.9984	0.9984

Kollektiv	SREBP-1 Polymorphismus (G1028G)					SREBP-2 Polymorphismus (A595G)				
	11	12	22	P	$\Delta PR^{3)}$ $\Delta TC^{5)}$	11	12	22	P	$\Delta PR^{4)}$ $\Delta TC^{6)}$
Prävalenz ¹⁾ TC Mittelwert ²⁾										
Kollektive von Individuen mit Störungen, die sekundäre Hyperlipoproteinämien verursachen										
DIA PR	39.30	43.67	17.03	(39)	0.1723	6.55	38.86	54.59	(125)	0.9282
TC	6.47	5.44	6.62	±2.57	0.6233	6.48	6.47	6.49	±2.05	0.9985
RIN PR	40.46	45.80	13.74	(18)	0.9197	6.11	40.46	53.44	(70)	0.7832
TC	7.27	7.15	6.96	±2.49	0.7193	7.44	7.14	7.16	±2.07	0.7692
LIV PR	38.51	47.30	14.19	(21)	0.9567	8.11	32.43	61.49	(91)	0.5249
TC	8.14	8.53	7.92	±2.11	0.6011	9.81	8.02	8.25	±2.43	0.0696
HTH PR	37.63	46.24	16.13	(15)	0.5545	6.45	24.73	68.82	(64)	0.9246
TC	6.17	6.55	6.00	±1.29	0.2678	7.46	7.09	6.00	±1.11	0.1174
Kollektive von Individuen mit Störungen, die möglicherweise mit SREBP-1 und/oder -2 in Zusammenhang stehen										
TTL - DAT PR	40.16	45.59	14.25	(347)	6.98	6.98	34.99	58.03	(1'413)	
TC	6.78	6.82	7.05	±2.63	0.2225	7.48	6.88	6.81	±2.39	0.0018
DAT PR	43.03	46.06	10.91	(18)	0.2318	2.42	37.58	60.00	(99)	0.0234
TC	6.14	6.24	5.92	±1.78	0.4050	7.44	6.14	6.12	±1.28	0.0487
HIV.STB PR	52.00	28.00	20.00	(5)	16.00	16.00	36.00	48.00	(12)	
TC	4.85	4.27	5.37	±1.37	0.2772	3.99	4.77	5.08	±1.32	0.1855
HIV.INC PR	40.00	60.00	0.00	(0)	0.0339	5.00	45.00	50.00	(10)	0.2433
TC	4.26	4.70	-	-	2.13	2.13	4.80	4.51	±0.98	0.0036

¹⁾ Prävalenz (=PR) in Prozent, (Anzahl der Individuen)

²⁾ Mittelwert der Plasmagesamtscholesterinkonzentrationen (=TC) in mmol/L, (±SD)

³⁾ ΔPR = PR11/12 vs. PR22; Signifikanzhöhe (P) des Unterschieds zwischen der Prävalenz des Kollektivs (PR.Kollektiv) vs. Prävalenz aller Individuen (PR.TTL) minus Prävalenz des entsprechenden Kollektivs (PR.Kollektiv): (P von PR.Kollektiv vs. (PR.TTL - PR.Kollektiv))

⁴⁾ ΔPR = PR11 vs. PR12/22; Signifikanzhöhe (P) des Unterschieds zwischen der Prävalenz des Kollektivs (PR.Kollektiv) vs. Prävalenz aller Individuen (PR.TTL) minus Prävalenz des entsprechenden Kollektivs (PR.Kollektiv): (P von PR.Kollektiv vs. (PR.TTL - PR.Kollektiv))

⁵⁾ ΔTC = TC11/12 vs. TC22 / ⁶⁾ ΔTC = TC11 vs. TC12/22

Literaturangaben:

(Literatur wird im Text direkt zitiert oder aber es wird
5 auf die unten angeführten Dokumente durch Nennung der
entsprechenden Zitatnummer (in Klammer) verwiesen)

1. Miller, S. A. 1988. A simple salting out
10 procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res. 16:1215.

2. Miserez, A. R., R. Laager, N. Chiodetti
und U. Keller. 1994. High prevalence of familial defective
apolipoprotein B-100 in Switzerland. *J. Lipid Res.*
15 35:574-583.

3. Hobbs, H. H., M. S. Brown, und J. L. Gold-
stein. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene
in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 1:445-466.

4. Sambrook, J., F. Fritsch, und T. Mania-
20 tis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold
Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition.:

5. Hixson, J. E. und D. T. Vernier. 1990. Re-
striction isotyping of human apolipoprotein E by gene am-
plification and cleavage with Hha I. *J. Lipid Res.*
25 31:545-548.

6. Ruzicka, V., W. März, A. Russ, und W.
Gross. 1992. Apolipoprotein B(Arg3500 to Gln) allele spe-
cific polymerase chain reaction: large-scale screening of
pooled blood samples. *J. Lipid Res.* 33:1563-1567.

7. Schuster, H., G. Rauh, S. Müller, C. Kel-
30 ler, G. Wolfram, und N. Zöllner. 1992. Allele-specific
and asymmetric polymerase chain reaction amplification in
combination: a one step polymerase chain reaction proto-
col for rapid diagnosis of familial defective apolipopro-
35 tein B-100. *Anal. Biochem.* 204:22-25.

8. Hansen, P. S., N. Rüdiger, A. Tybjaerg-Hansen, O. Faergeman, und N. Gregersen. 1991. Detection of the apoB-3500 mutation (glutamine for arginine) by gene amplification and cleavage with MspI. *J. Lipid Res.* 32:1229-1233.
9. Miserez, A. R., H. Schuster, N. Chiodetti, und U. Keller. 1993. Polymorphic Haplotypes and recombination rates at the LDL receptor gene locus in subjects with and without familial hypercholesterolemia who are from different populations. *Am. J. Hum. Genet.* 52:808-826.
10. Miserez, A. R. und U. Keller. 1995. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:1719-1729.
11. Hua, X., J. Sakai, Y. K. Ho, J. L. Goldstein, und M. S. Brown. 1995. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J. Biol. Chem.* 270:29422-29427.
12. Hua, X., C. Yokoyama, J. Wu, M. R. Briggs, M. S. Brown, J. L. Goldstein, und X. Wang. 1993. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11603-11607.
13. Oberhänsli, I., D. Pometta, H. Micheli, L. Raymond, und A. Suenram. 1982. Lipid, lipoprotein and apo-A and apo-B lipoprotein distribution in Italian and Swiss schoolchildren. The Geneva Survey. *Pediatr. Res.* 16:665-669.
14. Burnand, B., V. Wietlisbach, W. Riesen, G. Nosedà, M. Barazzoni, M. Rickenbach, und F. Gutzwiller. 1993. Lipides sanguins dans la population suisse:

enquête MONICA 1988-89. *Schweiz. Med. Wschr.*
123 (Suppl.48):29-37.

15. Tontonoz, P., J. B. Kim, R. A. Graves,
und B. M Spiegelman. 1993. ADD1: a novel helix-loop-helix
5 transcription factor associated with adipocyte determina-
tion and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 13:4753-4759.

16. Yokoyama, C., X. Wang, M. R. Briggs, A.
Admon, J. Wu, X. Hua, und J. L. Goldstein. 1993. SREBP-1,
a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that con-
10 trols transcription of the low density lipoprotein recep-
tor gene. *Cell* 75:187-197.

17. Kan, H. Y., P. Pissios, J. Chambaz, und
V. I. Zannis. 1999. DNA binding specificity and transac-
tivation properties of SREBP-2 bound to multiple sites on
15 the human apoA-II promoter. *Nucleic Acids Res.*
27(4):1104-1117.

18. Sakai, J., A. Nohturfft, J. L. Goldstein,
und M. S. Brown. 1998. Cleavage of Sterol Regulatory Ele-
ment-binding Proteins (SREBPs) at Site-1 Requires Inter-
20 action with SREBP Cleavage-activating Protein. (Evidence
from *in vivo* competition studies). *J. Biol. Chem.*
273(10):5785-5793.

19. Brown, M. S. und J. L. Goldstein. 1997.
The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism
25 by Proteolysis of a membrane-bound transcription factor.
Cell 89:331-340.

20. Hua, X., J. Wu, J.L. Goldstein, M.S.
Brown, und H.H. Hobbs. 1995. Structure of the human gene
encoding sterol regulatory element binding protein-1
30 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromo-
somes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25:667-673.

21. Miserez, A.R., G. Cao, L. C. Probst, und
H.H. Hobbs. 1997. Structure of the human gene encoding
sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Ge-
35 nomics* 40:31-40.

Ansprüche

1. Verfahren zur Erkennung eines erhöhten oder erniedrigten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos
5 und/oder einer erhöhten oder erniedrigten Sensitivität auf Therapieverfahren resp. deren Nebenwirkungen, dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme, das Blut resp. Gewebe auf das Vorhandensein eines Polymorphismus in mindestens einem Sterol-Regulator Element-
10 Bindenden-Protein (SREBP) untersucht wird, wobei das Vorhandensein eines Polymorphismus auf Amino- und/oder Nukleinsäure-Ebene bestimmt wird.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das SREBP ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend SREBP-1 und SREBP-2.
15

3. Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus zu einer erhöhten oder erniedrigten Aktivierung von Genen im Lipidstoffwechsel, insbesondere im Cholesterinstoffwechsel
20 führt.

4. Verfahren gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus zu erhöhter oder erniedrigter Plasmakonzentration mindestens eines Lipids, insbesondere von Cholesterin, führt.
25

5. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Vorhandenseins eines Polymorphismus auf Nukleinsäure-Ebene erfolgt.

6. Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus eine Erkennungssequenz für eine innerhalb des Polymorphismus liegende Schnittstelle aufweist und dass die Untersuchung unter Verwendung dieser Erkennungssequenz erfolgt.
30

7. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungssequenz eine Erkennungssequenz für XmnI oder MspI ist, d.h. GAANNNTTC oder CCGG, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann.
35

8. Verfahren gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung unter Verwendung einer SREBP-Sequenz oder einer SREBP-Teilsequenz erfolgt, die eine Nukleinsäure-Sequenz ausgewählt aus der Gruppe
5 der nachfolgend aufgeführten Sequenzen, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuren aus der natürlichen Nachbarschaft der entsprechenden Sequenz, umfasst:

SREBP-1, Exon 18c (Seq. Id. Nr. 3):

GCACCTAGGGAAAGGCTTC

10 SREBP-2, Exon 1^a (Seq. Id. Nr. 7):

CTGCTGCCGGCAACCTACA

9. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung unter Verwendung einer SREBP-Sequenz oder einer SREBP-Teilsequenz erfolgt,
15 die die folgende Nukleinsäure-Sequenz, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuren aus der natürlichen Nachbarschaft dieser Sequenz, umfasst:

SREBP-2, Exon 6: CTGAAGAAG

10. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1
20 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Vorhandenseins eines Polymorphismus auf Aminosäure-Ebene erfolgt.

11. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1
bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewe-
25 beentnahme und DNA-Extraktion mindestens ein Teilstück eines Exons eines SREBP, das einen Polymorphismus enthält, unter Verwendung zweier Oligonukleotidsequenzen amplifiziert wird, wobei der Polymorphismus charakteristisch ist für eine erhöhte oder erniedrigte Aktivierung
30 von Genen im Lipidstoffwechsel insbesondere im Cholesterinstoffwechsel, und dass das Produkt der Amplifikation einer Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder einer Denaturierung unterworfen wird und dass die Verdauungs- resp. Denaturierungsprodukte elektrophoretisch
35 aufgetrennt werden.

12. Verfahren gemäss Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus charakteri-

Bereichen der Sequenz des in einer Population am häufigsten auftretenden Typs des entsprechenden SREBP und Untersuchung der Sequenzen mit gefundenen Unterschieden auf Fehlfunktion.

5 16. Verfahren gemäss Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterschiede zu einer anderen Aminosäure und/oder insbesondere zu einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym führen.

10 17. Verwendung des Verfahrens gemäss einem der Ansprüche 11 bis 16, zur Bestimmung des erhöhten oder erniedrigten Risikos für Hypercholesterinämie und/oder Alzheimer Krankheit.

15 18. Verwendung des Verfahrens gemäss einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Bestimmung eines erhöhten oder erniedrigten Risikos für das Auftreten von Nebenwirkungen bei der HIV-Therapie, insbesondere der Therapie mit Proteasehemmern.

20 19. Verwendung des Verfahrens gemäss einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Bestimmung eines erhöhten oder erniedrigten Mortalitätsrisikos.

20. DNA- und/oder RNA-Chip, dadurch gekennzeichnet, dass er mindestens einen Polymorphismus auf einem SREBP, insbesondere SREBP-1 und/oder SREBP-2, aufweist.

25 21. DNA- und/oder RNA-Chip gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus ein Polymorphismus auf SREBP-1 und/oder SREBP-2 wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert, ist.

30 22. DNA- oder RNA-Chip gemäss Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass er den SREBP Polymorphismus in Gegenwart anderer Polymorphismen, die für die Abschätzung des Risikos für Hypercholesterinämie und/oder Alzheimer-Krankheit charakteristisch sind, aufweist.

35 23. Verwendung eines Polymorphismus wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 als Marker zur

stisch ist für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholesterinämie beim Menschen.

13. Verfahren gemäss Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der Oligonukleotidsequenzen im Intronbereich angesiedelt ist, der dem Exon benachbart ist, in dem der Polymorphismus existiert.

14. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenzen ausgewählt sind aus den folgenden Paaren oder damit unter stringenten Bedingungen hybridisierenden Sequenzen:

S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9):

5'-TTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und

S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10):

5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

EcoR I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11):

5'-CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und

EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12):

5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13):

5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und

S2.10P.R. (Seq. Id. Nr. 14):

5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' oder

EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15):

5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und

EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16):

5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3'

EcoRI S2.6F (Seq. Id. Nr. 17):

5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTCACTCATC-3'

EcoRI S2.6R (Seq. Id. Nr. 18):

5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3'.

15. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus ermittelt worden ist durch amplifizieren und analysieren einer interessierenden SREBP-Sequenz, Vergleich der Exon-Bereiche dieser interessierenden Sequenz mit den Exon-

Bestimmung eines erhöhten oder verminderten Risikos für den Ausbruch einer Krankheit.

24. Verwendung gemäss Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus Hypercholesterinämie und Alzheimer-Krankheit.

25. Verwendung eines Polymorphismus wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Bestimmung eines erhöhten oder erniedrigten Risikos für das Auftreten von Nebenwirkungen bei der HIV-Therapie, insbesondere der Therapie mit Proteasehemmern.

26. Verwendung eines Polymorphismus wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Bestimmung eines erhöhten oder verminderten Mortalitätsrisikos.

27. Verwendung eines Polymorphismus, wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Prüfung der Eignung einer Behandlungsmethode für eine Krankheit ausgewählt aus der Gruppe umfassend Hypercholesterinämie, Alzheimer-Krankheit und HIV, oder für das Wirkstoffscreening.

28. Polymorphismus, der charakteristisch ist für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholesterinämie beim Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass er in einem Sterol-Regulator Element-Bindenden-Protein (SREBP) auftritt.

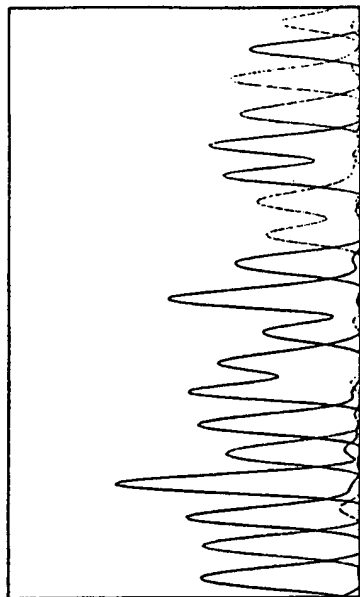
29. Polymorphismus gemäss Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass er im SREBP-1 oder SREBP-2 auftritt.

30. Polymorphismus gemäss Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass er eine Erkennungssequenz für XmnI oder MspI aufweist, d.h. GAANNNTTC oder CCGG, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann.

31. Polymorphismus gemäss Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass er die folgenden Sequenzen aufweist:

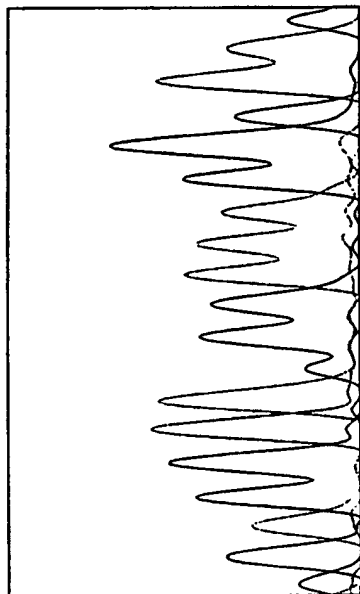
SREBP-1, Exon 18c (Seq. Id. Nr. 1):
GCACCTAGGGAAAGGCTTC
SREBP-2, Exon 10 (Seq. Id. Nr. 5):
CTGCTGCCGGCAACCTACA.

SREBP-2 Polymorphismus



CTGCTGCGG^G_CCAACCTACA

SREBP-1 Polymorphismus



Mutierte DNA GCACCTAGG^G_CAAAGGCTTC
Wildtyp-DNA

CTGCTGCGG^G_CCAACCTACA

Msp I

A	A	G	N	L
		↑		
A	A	A	N	L

Figur 1B

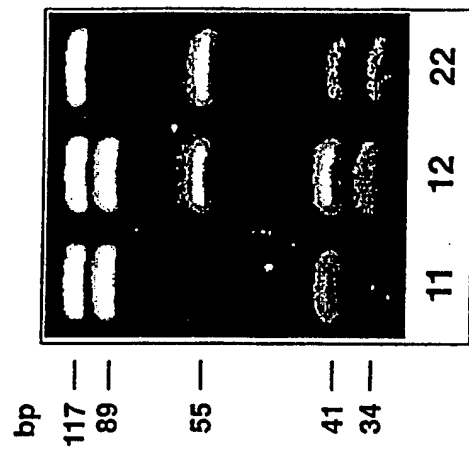
Mutierte DNA GCACCTAGGGAANNNTTC

Xmn I

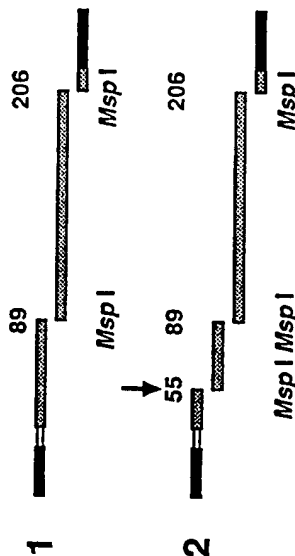
H	L	G	K	G
		↑		
H	L	C	K	G

Figur 1A

SREBP-2 Polymorphism

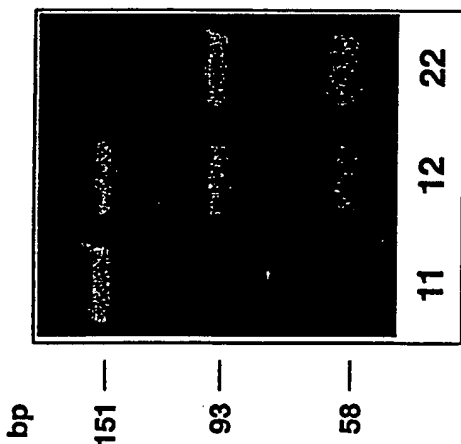


Intron 9 Exon 10

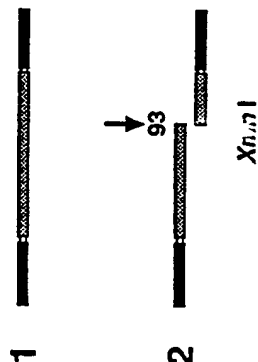


Figur 2B

SREBP-1 Polymorphism



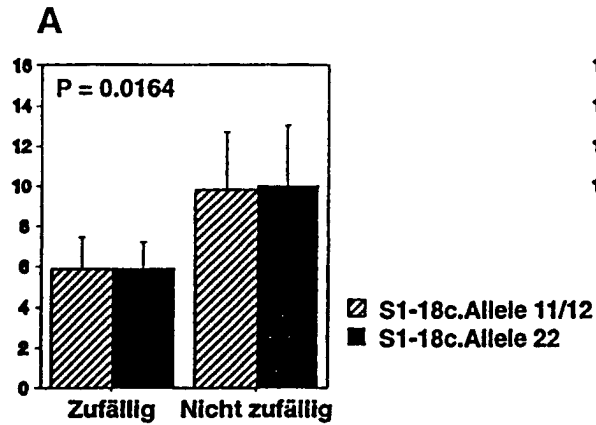
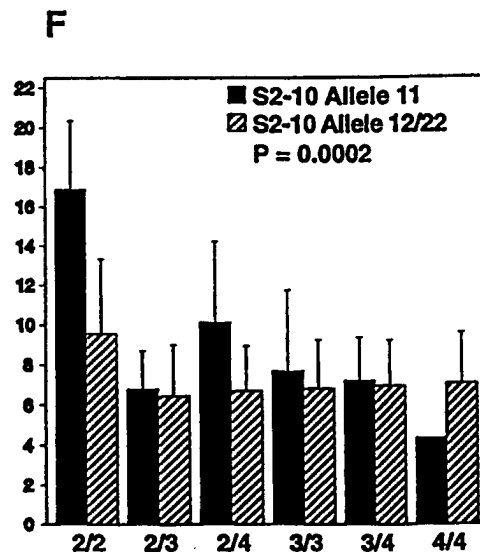
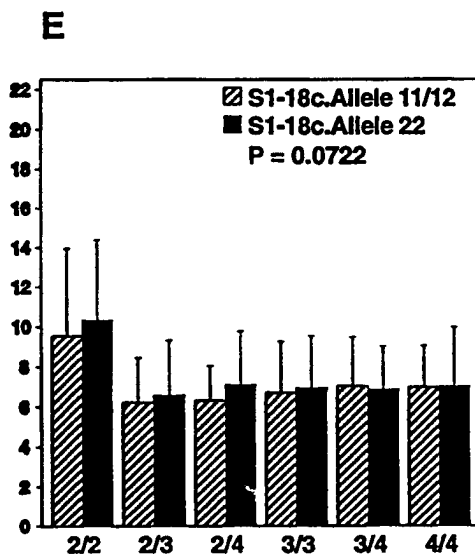
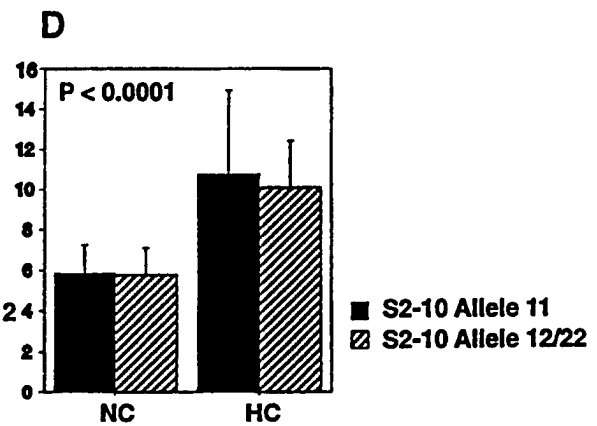
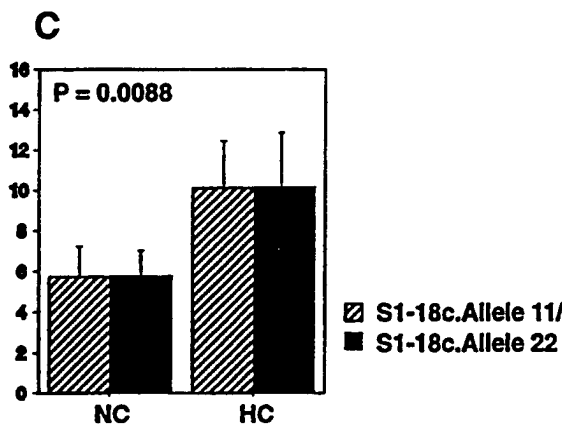
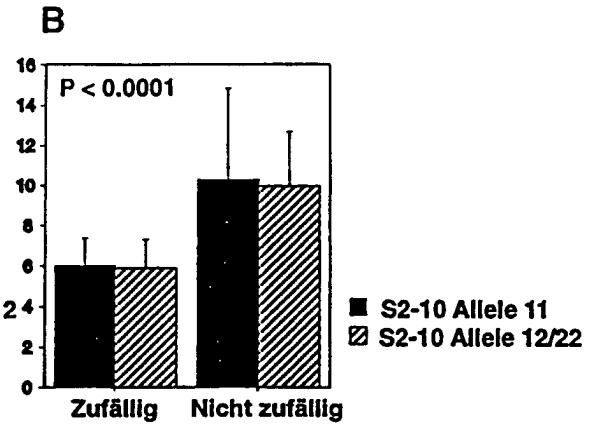
Intron 19a Exon 18c



Figur 2A

501 Rec'd PCT/F

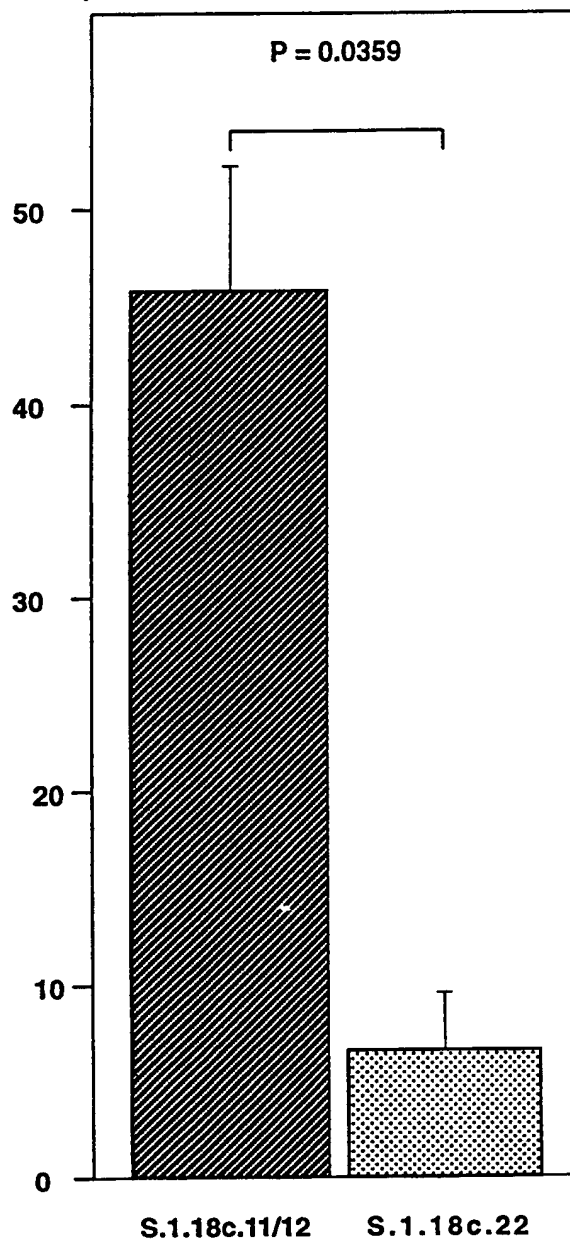
08 JAN 2002

SREBP-1 Polymorphismus
(mmol/L)**SREBP-2 Polymorphismus**
(mmol/L)

Figur 3

531 Rec'd PCT/PTC 08 JAN 2002

**Änderung der
Gesamtcholesterinkonzentration
nach Proteaseinhibitorbehandlung
(in Prozent)**



Figur 4

531 Rec'd PCTA 08 JAN 2002

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Miserez, André R.

<120> DNA-Polymorphismen in Stero-Regulator Element-Bindenden
Proteinen

<130> Seq. Listing zu 02280PC

<140>

<141>

<150> CH 1277/99

<151> 1999-07-09

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(19)

<400> 1

g cac cta ggc aaa ggc ttc

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

19

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(19)

<400> 3

g cac cta ggg aaa ggc ttc

19

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctgctgccgc caacctaca

19

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ala Ala Ala Asn Leu Gln

1

5

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 11

cggaattctg aaattattta taatctgggt tttgtgtc

38

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 12

cggaattcat cggggaagag ctaagttaaa agttgtg

37

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 13

gccagtgacc attaacacct ttgga

25

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 14

tcgtcttcaa agcctgcctc agtggctggc

30

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 15

cggaattcgc cagtgaccat taacaccttt tga

33

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 16

cggaattctg cagcaagcca gtcacagca gct

33

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 17
cggaattctg gtctcactgt gttttcactc atc 33

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 18
cggaattcgc cagggtgac aagccttttc tca 33

<210> 19
<211> 46
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 19
gccagaggag attttgcagc tgctgccggc aacctacaaa cctgcc 46

<210> 20
<211> 46
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 20
ggcagggttg taggttgccg gcagcagctg caaaatctcc tctggc 46

ctgctgccgg caacctaca

19

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ala Ala Gly Asn Leu Gln

1

5

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 9

ttattaataa tctgggtttt gtgtc

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 10

gggaagagct aagttaaaag ttgtg

25

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCT) AND THE AGREEMENT RELATING TO THE AMENDMENT OF THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT AMENDMENT AGREEMENT)

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/04352 A3(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB00/00918

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juli 2000 (07.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
1277/99 9. Juli 1999 (09.07.1999) CHCZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 2. August 2001(71) Anmelder und
(72) Erfinder: MISEREZ, André, R. [CH/CH]; St. Jakob-
strasse 70, CH-4147 Aesch (CH).(74) Anwalt: E. BLUM & CO.; Vorderberg 11, CH-8044
Zürich (CH).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DNA POLYMORPHISMS IN STEROL REGULATOR ELEMENT BINDING PROTEINS

WO 01/04352 A3

(54) Bezeichnung: DNA-POLYMORPHISMEN IN STEROL-REGULATOR ELEMENT-BINDENDEN PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA polymorphisms in sterol regulator element binding proteins (SREBP) that are characteristic of a higher risk of genetic diseases in humans such as hypercholesterolaemia. The corresponding polymorphisms, especially the polymorphisms on SREBP-1 and SREBP-2 are frequently observed in Alzheimer patients (SREBP-2). They are also characterized by a specific behavior in the therapy of HIV patients with protease inhibitors and appear to have an influence on the mortality.

(57) Zusammenfassung: Es werden Polymorphismen in Sterol-Regulator Element-Bindenden-Proteinen (SREBP) beschrieben, die charakteristisch für erhöhtes Risiko genetischer Krankheiten beim Menschen, wie Hypercholesterinämie, sind. Die entsprechenden Polymorphismen, insbesondere Polymorphismen auf SREBP-1 und SREBP-2, zeigen darüber hinaus auch sehr interessante Häufung bei Alzheimer-Patienten (SREBP-2), spezielles Verhalten bei Therapie mit Protease-Hemmern bei HIV-Patienten sowie einen Einfluss auf die Mortalität.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
P/IB 00/00918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MISEREZ ANDREW G ET AL: "Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2)." GENOMICS, vol. 40, no. 1, 1997, pages 31-40, XP002159138 ISSN: 0888-7543 cited in the application the whole document — -/-	1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 2001

Date of mailing of the international search report

22/02/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter-
 P B 00/00918

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MISEREZ: "Die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts"</p> <p>UNI NOVA, WISSENSCHAFTSMAGAZIN DER UNIVERSITÄT BASEL, 'Online!</p> <p>vol. 81, April 1998 (1998-04), XP002159139</p> <p>Retrieved from the Internet:</p> <p><URL:http://www.zuv.unibas.ch/uni_nova/081/11.shtml> 'retrieved on 2001-01-30!</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
X	<p>US 891 631 A (WANG XIAODONG ET AL)</p> <p>6 April 1999 (1999-04-06)</p> <p>column 1-3</p> <p>column 7-11</p> <p>column 31-36; examples 3,4</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
X	<p>HUA XIANXIN ET AL: "Structure of the Human Gene Encoding Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBF1) and Localization of SREBF1 and SREBF2 to Chromosomes 17p11.2 and 22q13."</p> <p>GENOMICS,</p> <p>vol. 25, no. 3, 1995, pages 667-673,</p> <p>XP000979463</p> <p>ISSN: 0888-7543</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
A	<p>WANG XIAODONG ET AL: "Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis"</p> <p>THE EMBO JOURNAL,</p> <p>vol. 15, no. 5, 1996, pages 1012-1020,</p> <p>XP002159140</p> <p>page 1015; figure 6</p>	<p>1-31</p>
A	<p>BROWN MS UND GOLDSTEIN JL: "The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor"</p> <p>CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US,</p> <p>vol. 89, 2 May 1997 (1997-05-02), pages 331-340, XP002123067</p> <p>ISSN: 0092-8674</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	<p>1-31</p>

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 00/00918

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SHIMANO HITOSHI IICHIRO SHIMOMURA ET AL: "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 100, no. 8, 1997, pages 2115-2124, XP002931070 ISSN: 0021-9738 the whole document</p>	1-31
A	<p>HACIA JOSEPH G ET AL: "Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays." GENOME RESEARCH, vol. 8, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 1245-1258, XP002925459 ISSN: 1088-9051 the whole document</p>	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

P 00/00918

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5,000,031 A	06-04-1999	US 5527690 A	18-06-1996
		US 5498696 A	12-03-1996
		AU 6911194 A	12-12-1994
		EP 0698115 A	28-02-1996
		WO 9426922 A	24-11-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

T/IB 00/00918

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MISEREZ ANDREW G ET AL: "Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2)." GENOMICS, Bd. 40, Nr. 1, 1997, Seiten 31-40, XP002159138 ISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument — — — — — -/-	1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Februar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/02/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGELEGENHEIT UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MISEREZ: "Die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts"</p> <p>UNI NOVA, WISSENSCHAFTSMAGAZIN DER UNIVERSITÄT BASEL, 'Online!</p> <p>Bd. 81, April 1998 (1998-04), XP002159139</p> <p>Gefunden im Internet:</p> <p><URL:http://www.zuv.unibas.ch/uni_nova/081/11.shtml> 'gefunden am 2001-01-30!</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>das ganze Dokument</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
X	<p>US 5 891 631 A (WANG XIAODONG ET AL)</p> <p>6. April 1999 (1999-04-06)</p> <p>Spalte 1-3 Spalte 7-11 Spalte 31-36; Beispiele 3,4</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
X	<p>HUA XIANXIN ET AL: "Structure of the Human Gene Encoding Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBF1) and Localization of SREBF1 and SREBF2 to Chromosomes 17p11.2 and 22q13."</p> <p>GENOMICS, Bd. 25, Nr. 3, 1995, Seiten 667-673, XP000979463 ISSN: 0888-7543 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	<p>1-6, 10-13, 15-17, 19,23, 24,26,27</p>
A	<p>WANG XIAODONG ET AL: "Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis"</p> <p>THE EMBO JOURNAL, Bd. 15, Nr. 5, 1996, Seiten 1012-1020, XP002159140 Seite 1015; Abbildung 6</p>	<p>1-31</p>
A	<p>BROWN MS UND GOLDSTEIN JL: "The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor"</p> <p>CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 89, 2. Mai 1997 (1997-05-02), Seiten 331-340, XP002123067 ISSN: 0092-8674 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	<p>1-31</p>

-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SHIMANO HITOSHI IICHIRO SHIMOMURA ET AL: "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 100, Nr. 8, 1997, Seiten 2115-2124, XP002931070 ISSN: 0021-9738 das ganze Dokument	1-31
A	HACIA JOSEPH G ET AL: "Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays." GENOME RESEARCH, Bd. 8, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 1245-1258, XP002925459 ISSN: 1088-9051 das ganze Dokument	1-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

IB 00/00918

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5891631 A	06-04-1999	US 5527690 A	18-06-1996
		US 5498696 A	12-03-1996
		AU 6911194 A	12-12-1994
		EP 0698115 A	28-02-1996
		WO 9426922 A	24-11-1994

(12) NACH DEM VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/04352 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB00/00918

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juli 2000 (07.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
1277/99 9. Juli 1999 (09.07.1999) CH

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MISEREZ, André, R. [CH/CH]; St. Jakob-
strasse 70, CH-4147 Aesch (CH).

(74) Anwalt: E. BLUM & CO.; Vorderberg 11, CH-8044
Zürich (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DNA POLYMORPHISMS IN STEROL REGULATOR ELEMENT BINDING PROTEINS

(54) Bezeichnung: DNA-POLYMORPHISMEN IN STEROL-REGULATOR ELEMENT-BINDENDEN PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA polymorphisms in sterol regulator element binding proteins (SREBP) that are characteristic of a higher risk of genetic diseases in humans such as hypercholesterolaemia. The corresponding polymorphisms, especially the polymorphisms on SREBP-1 and SREBP-2 are frequently observed in Alzheimer patients (SREBP-2). They are also characterized by a specific behavior in the therapy of HIV patients with protease inhibitors and appear to have an influence on the mortality.

(57) Zusammenfassung: Es werden Polymorphismen in Sterol-Regulator Element-Bindenden-Proteinen (SREBP) beschrieben, die charakteristisch für erhöhtes Risiko genetisch bedingter Krankheiten beim Menschen, wie Hypercholesterinämie, sind. Die entsprechenden Polymorphismen, insbesondere Polymorphismen auf SREBP-1 und SREBP-2, zeigen darüber hinaus auch sehr interessante Häufung bei Alzheimer-Patienten (SREBP-2), spezielles Verhalten bei Therapie mit Protease-Hemmern bei HIV-Patienten sowie einen Einfluss auf die Mortalität.

WO 01/04352 A2

DNA-Polymorphismen in Sterol-Regulator Element-Bindenden Proteinen

Verweis auf entsprechende Anmeldungen

5

Die vorliegende Anmeldung beansprucht die Priorität der Schweizer Anmeldung Nr. 1277/99 vom 9. Juli 1999, deren Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

10

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft Polymorphismen, insbesondere Desoxyribonukleinsäuren (DNA oder DNS)-Polymorphismen, in Sterol-Regulator Element-Bindenden Proteinen, insbesondere Protein-1 (SREBP-1) und Protein-2 (SREBP-2), resp. die Verwendung solcher Polymorphismen für die Diagnostik, aber auch für das Wirkstoff-Screening.

20

Stand der Technik

Epidemiologische Langzeitstudien haben in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Faktoren identifiziert, die die Atherosklerose-Entstehung beschleunigen, und damit die Entstehung von Herzinfarkten fördern. Trotz der Vermeidung von Umweltfaktoren und von Verhaltensweisen, die das Atherosklerose-Risiko erhöhen, kann es schon bei jüngeren Erwachsenen zu ausgeprägten atherosklerotischen Veränderungen bis hin zum Herzinfarkt kommen. In solchen Fällen spielen Erbfaktoren eine entscheidende Rolle. Es ist beispielsweise bekannt, dass Defekte von Genen, die im Cholesterinstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, die Medikation mit cholesterinsenkenden Mitteln erfordern. Durch die frühzeitige Erkennung eines genetischen Defekts lassen sich so rechtzeitig Gegenmassnahmen ergreifen.

Es ist deshalb sowohl vom diagnostischen als auch vom therapeutischen Standpunkt aus sehr wünschenswert wesentliche genetische Veränderungen erkennen und nachweisen zu können (siehe A. R. Miserez, Die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts, *uni nova*, April 1998, S. 44-52).

Cholesterin ist, neben seiner Eigenschaft als Vorläufer von Steroidhormonen und Gallensäuren, ein essentieller Bestandteil der Zellmembranen, der die Permeabilität der letzteren entscheidend beeinflusst. Menschliche Zellen kontrollieren ihren intrazellulären Cholesteringehalt in engen Grenzen durch die Regulation der rezeptorvermittelten Aufnahme extrazellulärer, cholesterinenthaltender Lipoproteinepartikel niedriger Dichte (low density lipoproteins, LDL) und durch die Steuerung der intrazellulären Cholesterinbiosynthese. LDL-Partikel binden sich an den LDL-Rezeptor (LDLR) mittels ihrer Apolipoprotein (Apo) B-Anteile. Die Bindung und die nachfolgende Internalisierung dieser Lipoprotein-Rezeptor-Komplexe kann teilweise oder vollständig unterbrochen sein, wenn eines der an diesem Prozess beteiligten Proteine defekt ist oder fehlt. Mutationen der Gene, die das Apolipoprotein E (Mutationen führen zu familiärer Dysbetalipoproteinämie (FBL)), das Apolipoprotein B-100 (Mutationen führen zu familiär-defektivem Apo B (FDB)), sowie den LDL-Rezeptor (Mutationen führen zu familiärer Hypercholesterinämie (FH)) kodieren, resultieren in einer Ansammlung von cholesterinenthaltenden Partikeln im Plasma, was mit einem Anstieg des Risikos für koronare Herzkrankheit einhergeht. Mit diesen Mutationen können aber in den meisten untersuchten Populationen nur 4.2 bis 7 % der Fälle mit Hypercholesterinämie (definiert als die 10 % der Personen einer Population mit LDLC-Konzentrationen über dem 90ten Perzentil) erklärt werden. Folglich sind die bei der Mehrzahl der betroffenen Personen mit erhöhtem Plasma-LDLC ursächlichen Gendefekten noch nicht identifiziert.

Die Promotoren des LDLR-Gens sowie der Gene, die in der Cholesterinbiosynthese eine Rolle spielen, wie zum Beispiel die Hydroxymethylglutaryl-(HMG)-CoA-Synthase-, die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase- und die Squalen-Synthase-Gene, enthalten spezifische Nukleotidsequenzen, die sogenannten Sterol-Regulator-Elemente (SRE).

Es ist ebenfalls bereits bekannt, dass zwei Proteine, die SRE-bindenden Proteine SREBP-1 und SREBP-2, an die SRE in den Promotoren dieser Gene binden und deren Transkriptionsrate aktivieren. Bei einem Mangel an Sterolen innerhalb der Zelle werden beide Proteine durch jeweils zwei proteolytische Schritte aktiviert, zunächst durch einen Sterol (bzw. Cholesterol)-sensitiven Schritt und danach durch einen Sterol-unabhängigen Schritt. Durch diese Proteolyseschritte entstehen 68 kDa grosse Proteine aus der NH₂ Region der sich im Zytoplasma befindlichen SREBP-1- und SREBP-2-Vorläuferproteine. Die am Amino-Ende freigesetzte, reife Form der Transkriptionsfaktoren wandert in den Zellkern und bindet sich an die SRE der Promotoren von Cholesterin-regulierenden Genen. In der Folge werden diese Gene aktiviert, was zu einer Erhöhung der rezeptorvermittelten Aufnahme von LDL und zu einer verstärkten intrazellulären Cholesterinbiosynthese führt.

Sobald sich Cholesterin in der Zelle anhäuft, wird der erste, Cholesterin-empfindliche Schritt inhibiert, die reifen Formen der SREBP verschwinden und die Transkriptionsraten vermindern sich, wodurch eine zu grosse Akkumulation von Cholesterin in der Zelle verhindert wird. SREBP-1 und SREBP-2 regulieren zahlreiche SRE-enthaltende Gene, die in die Cholesterin-Homöostase involviert sind, SREBP-1 aktiviert zusätzlich die HMG-CoA-Reduktase und die Squalen-Synthase. SREBP-1 und SREBP-2 sind Mitglieder der sogenannten basischen Helix-Loop-Helix Leucine Zipper Transkriptionsfaktor-Familie. Die Gene, die diese Faktoren kodieren, wurden kürzlich kloniert und in ihrer genetischen Struktur charakterisiert (20, 21).

Trotz all dieser bereits gewonnenen Erkenntnisse liegt aber - wie bereits oben erwähnt - die Zahl der erkennbaren Risikopatienten für z.B. Hypercholesterinämie bei unter 7 %.

5 Ziel der vorliegenden Erfindung war es deshalb, die Frühdiagnose und die Therapie von Risikopatienten zu verbessern.

Dieses Ziel wurde dadurch erreicht, dass Diagnoseverfahren sowie für deren Durchführung geeignete Polymorphismen auf den SREBP-Genen bereitgestellt werden, insbesondere Polymorphismen, die bei einem Teil der Patienten mit Änderungen im Lipidhaushalt, insbesondere im Cholesterinhaushalt, vorzugsweise bei einem bedeutenden Teil solcher Patienten, auftreten.

15

Darstellung der Erfindung

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist folglich ein Verfahren zur Erkennung eines erhöhten oder erniedrigten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos und/oder einer erhöhten oder erniedrigten Sensitivität auf Therapieverfahren resp. deren Nebenwirkungen.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind die Verwendung von Polymorphismen zur Diagnose, zur Beurteilung von Behandlungen gegen Krankheiten und zum Wirkstoffscreening, sowie die Bereitstellung geeigneter Polymorphismen.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass Polymorphismen auf Sterol-Regulator Element-Bindenden-Proteinen (SREBP), insbesondere SREBP-1 und SREBP-2, Indikatoren für Gesundheits- resp. Therapierisiken sind. Das erfindungsgemäße Verfahren ist deshalb dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme, das Blut resp. Gewebe auf das Vorhandensein eines Polymorphismus in mindestens einem SREBP untersucht wird, wobei das Vorhandensein eines Polymorphismus auf Amino- und/oder Nukleinsäure-Ebene bestimmt werden kann. Der Begriff Poly-

morphismus, wie er im Rahmen dieser Erfindung gebraucht wird, beschreibt jede natürlich im Menschen vorkommende Sequenzvariation, vorzugsweise aber eine Sequenzvariation, die bei einem grossen Bevölkerungsanteil vorkommt.

5 In einem bevorzugten Verfahren werden entsprechende Nukleinsäuresequenzen, die einen charakteristischen Polymorphismus aufweisen, insbesondere einen Polymorphismus von SREBP-1 und/oder SREBP-2, auf einem DNA- und/oder RNA-Chip verwendet, sog. Microarray (DNA Chip)
10 Technologie. Andere Verfahren sind beispielsweise PCR und darauffolgende Restriktionsenzymverdauung, beispielsweise mit *Msp* I bzw. *Xmn* I; "Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)"-Verfahren; "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)"-Verfahren; "Protein Truncation
15 Test (PTT)"-Verfahren; "Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)"-Verfahren; "Cleavage Fragment Length Polymorphisms (CFLP)"-Verfahren; "Chemical Cleavage of Mismatches"-Verfahren; Sequenzierung; Minisequenzierung (Snap-shot-Sequenzierung); auf "High Pressure Liquid
20 Chromatography (HPLC)" basierende Verfahren (dHPLC); auf Massenspektroskopie basierende Verfahren; Dot blot-Verfahren (allelspezifische Oligonukleotide); allelspezifisches PCR-Verfahren (allelspezifische Oligonukleotide); "Real-Time" quantitative PCR-Spectrophotometrie (z.B.
25 TaqMan™, Light Cycler™); und "Luminescent non-gel based molecular interrogation".

Mit den im Rahmen dieser Erfindung speziell interessierenden Polymorphismen, insbesondere jenen, die auf den SREBP-1 und SREBP-2 Genen gefunden wurden, geht
30 eine geänderte Funktionsfähigkeit der Proteine einher. In Anwesenheit der unten näher beschriebenen Mutationen im SREBP-1- und SREBP-2-Gen beispielsweise wird das LDL-Rezeptorgen weniger oder besser aktiviert, was zu veränderten Cholesterinspiegeln beim Menschen führt.

35 Ferner wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, dass entsprechende Polymorphismen Indikatoren für erhöhtes oder erniedrigtes Krankheitsrisiko

sind, insbesondere für erhöhtes resp. erniedrigtes Risiko an Hypercholesterinämie oder der Alzheimer-Krankheit zu erkranken. Sie ermöglichen auch die Beurteilung des Risikos für das Auftreten von Problemen bei der HIV-Therapie, insbesondere der Therapie mit Protasehemmern, und ermöglichen das Abschätzen des Risikos für die Entwicklung irgendeiner mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbundenen Erkrankung, dies auch unabhängig von einer gegebenenfalls assoziierten Cholesterinmodifikation oder Alzheimer-Krankheit.

Die Erfindung wird unten und in den Figuren näher beschrieben.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Figur 1A zeigt ein Chromatogram zur Identifizierung des Exon-Polymorphismus in SREBP-1, und den ermittelten Polymorphismus, nämlich eine Mutation im SREBP-1 Gen (Exon 18c) an Aminosäureposition 1028 (G1028G), die zu keinem Aminosäureaustausch führt, aber eine *Xmn* I Restriktionsschnittstelle generiert.

Figur 1B zeigt ein Chromatogram zur Identifizierung des Exon-Polymorphismus in SREBP-2 und den ermittelten Polymorphismus, nämlich eine Mutation im SREBP-2 Gen (Exon 10) an Aminosäureposition 595 (A595G), die zu einer Aminosäuresubstitution führt (Alanin zu Glycin) und eine zusätzliche *Msp* I Restriktionsschnittstelle generiert.

Figur 2A zeigt, wie mittels PCR Amplifikation des ganzen Exon 18c (SREBP-1) und darauffolgende Restriktionsenzymverdauung homozygote und heterozygote Träger der entsprechenden Mutation beim Screenen von grossen Personenkollektiven mit hohem Durchsatz identifiziert werden können.

Figur 2B zeigt, wie mittels PCR Amplifikation des 5'-Endes von Exon 10 (SREBP-2) und darauffolgende Restriktionsenzymverdauung homozygote und heterozygote Trä-

ger der entsprechenden Mutation beim Screenen von grossen
Personenkollektiven mit hohem Durchsatz identifiziert
werden können.

Figur 3 zeigt für SREBP-1 und für SREBP-2 den
5 Vergleich zwischen Trägern und Nicht-Trägern der Polymor-
phismen hinsichtlich der entsprechenden, gemittelten Ge-
samt-Cholesterinkonzentrationen und der Gen-Gen Interak-
tionen mit dem Apolipoprotein E-Gen.

Figur 4 zeigt die prozentuale Aenderung der
10 Plasmacholesterinspiegel vor und nach Gabe von Protease-
hemmern in Abhängigkeit vom G1028G Polymorphismus.

Wege zur Ausführung der Erfindung

15 Polymorphismen in den SREBP-Genen allgemein
können, wie unten für die SREBP-1- und SREBP-2-Gene be-
schrieben, ermittelt werden.

Die speziellen Polymorphismen können z.B. da-
durch bestimmt werden, dass Oligonukleotide entworfen
20 werden, die den Intron-Sequenzen der SREBP-1- und SREBP-
2-Gene entsprechen, die unmittelbar den Exon-/Intron-
Grenzen benachbart sind, und dass mittels der Einzel-
Strang-Konformations-Polymorphismus-Methode (SSCP) beide
Gene für Sequenzvariationen getestet werden.

25 Auf diese Weise wurden die folgenden relativ
häufig auftretenden Polymorphismen gefunden, die jeweils
dem normalen Gen gegenübergestellt werden, wobei NS die
Nukleotidsequenz und AS die Aminosäuresequenz bedeuten:

30 **SREBP-1 (Wild-Typ):**

NS G CAC CTA GGC AAA GGC TTC (Seq. Id. Nr. 1)
AS H L G K G F (Seq. Id. Nr. 2)

35 **SREBP-1-Exon 18c-Polymorphismus (SREBP-1- G1028G oder SREBP-1c-G1028G):**

NS G CAC CTA GGG AAA GGC TTC (Seq. Id. Nr. 3)
AS H L G K G F (Seq. Id. Nr. 4)

SREBP-2 (Wild-Typ):

NS CT GCT GCC GCC AAC CTA CA (Seq. Id. Nr. 5)
 AS A A A A A N L Q (Seq. Id. Nr. 6)

5 **SREBP-2-Exon 10-Polymorphismus (SREBP-2-A595G):**

NS CT GCT GCC GGC AAC CTA CA (Seq. Id. Nr. 7)
 AS A A A A G N L Q (Seq. Id. Nr. 8)

10 Analog wurde ein zwischenzeitlich im Rahmen einer Diplomarbeit veröffentlichter weiterer SREBP-2-Polymorphismus mit relativ grosser Häufigkeit ermittelt (siehe Diplomarbeit am Departement Forschung, Universitätskliniken Basel, von Patrick Y. Müller, "Sterol Regulatory Element Binding Protein 2: ..."), der in der Folge
 15 als SREBP-2-Exon-6-Polymorphismus oder SREBP-2-R371K bezeichnet wird.

Eine Gegenüberstellung der Sequenz des Wild-Typs und dieses weiteren Polymorphismus zeigt eine Änderung auf Proteinstufe, nämlich Mutation eines Arginins
 20 (R) zu einem Lysin (K) an Position 371 (R371K) in Exon 6, nämlich:

SREBP-2 (Wild-Typ):

NS CTG AGG AAG
 25 AS L R K

SREBP-2-Exon 6-Polymorphismus (SREBP-2-R371K):

NS CTG AAG AAG
 30 AS L K K

Wie aus den obigen Sequenzen ersichtlich ist, weist jeder der drei Polymorphismen eine geänderte Nukleinsäure im Exonbereich auf, wobei nur zwei der drei
 35 Polymorphismen, nämlich jene zu SREBP-2, eine Mutation aufweisen, die sich auf Proteinebene auswirkt (siehe dazu Figur 1A, Figur 1B). Alle drei Polymorphismen führen je-

doch zu neuen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, nämlich im SREBP-1 zu einer für *Xmn* I und im SREBP-2 zu einer für *Msp* I resp. einer für *Dde* I.

Selbstverständlich sind die entsprechenden
5 Polymorphismen auch in den Komplementärsträngen vorhanden, so dass im Rahmen der vorliegenden Erfindung überall, wo Bezug auf Nukleotidsequenzen gemacht wird, die entsprechende Offenbarung die Komplementärsequenzen einschliesst.

10 Da der Polymorphismus im SREBP-1-Gen nicht zu einer Änderung auf Proteinebene führt aber trotzdem mit dem Auftreten von Hypercholesterinämie korrelierbar ist, drängt sich der Schluss auf, dass dieser Polymorphismus mit einer oder mehreren Mutationen im selben Gen einher-
15 geht oder einen Einfluss auf der RNA-Ebene ausübt. Diese Annahme steht im Einklang mit der Tatsache, dass für den in SREBP-1 gefundenen Polymorphismus nicht nur ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Hypercholesterinämie gefunden wird, sondern gleichzeitig ein Zusammenhang mit einem
20 Mangel an Erhöhung der Gesamtcholesterin- und Triglycerid-Konzentration in HIV-Patienten nach der Verabreichung von Protease-Inhibitoren festgestellt wird. Dieser Polymorphismus ist deshalb ein wertvolles Hilfsmittel bei der Risikoabschätzung des Auftretens von unerwünschten Wir-
25 kungen und Einstellung einer Behandlung mit Protease-Hemmern.

Eine andere wichtige Eigenschaft der vorliegend beschriebenen Polymorphismen, insbesondere des SREBP-2-A595G-Polymorphismus, ist dessen Vorherrschen bei
30 Patienten mit der Alzheimer-Krankheit im Vergleich zu dessen Vorkommen in der Bevölkerung allgemein, nämlich 7 % bei Alzheimer Patienten gegenüber 2.4 % in der Bevölkerung allgemein.

Überraschenderweise wurde zudem gefunden,
35 dass alle drei oben näher beschriebenen Polymorphismen signifikanten Einfluss auf die Mortalität ihres Trägers haben.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass SREBP-2-A595G speziell geeignet ist um Aussagen über das Risiko für Cholesterinerhöhung an und für sich zu machen, währenddem SREBP-1c-G1028G insbesondere geeignet ist als prognostischer Marker für die individuelle Reaktion (Risiko der Cholesterinerhöhung) nach Gabe von Medikamenten. Für Aussagen über das Risiko für die Entwicklung der Alzheimer-Krankheit (auch unabhängig von einer gegebenenfalls assoziierten Cholesterinerhöhung oder -erniedrigung) ist SREBP-2-A595G bevorzugt, während für die Bestimmung des Risikos für die Entwicklung einer Erkrankung, die mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunden ist (auch unabhängig von einer gegebenenfalls assoziierten Cholesterinmodifikation oder Alzheimer-Krankheit) alle drei oben näher beschriebenen Polymorphismen geeignet sind, wobei SREBP-2-A595G und SREBP-1c-G1028G bevorzugt sind.

Während allgemein für das Verfahren Polymorphismen der SREBP geeignet sind, sind solche von SREBP-1 und/oder SREBP-2 bevorzugt, insbesondere aber Polymorphismen, die zu einer erhöhten oder erniedrigten Aktivierung von Genen im Lipidstoffwechsel, insbesondere im Cholesterinstoffwechsel führen. Dabei sind Polymorphismen, die zu erhöhter oder erniedrigter Plasmakonzentration mindestens eines Lipids, insbesondere von Cholesterin, führen weiter bevorzugt.

Es hat sich gezeigt, dass ein Polymorphismus, der eine Erkennungssequenz für eine innerhalb des Polymorphismus liegende Schnittstelle aufweist, sich speziell für ein Verfahren unter Verwendung dieser Erkennungssequenz eignet. Solche Erkennungssequenzen sind beispielsweise die Erkennungssequenz für *Xmn* I oder *Msp* I, d.h. GAANNNTTC oder CCGG, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann. Sequenzen, die solche Erkennungssequenzen enthalten sind beispielsweise

SREBP-1, Exon 18c:GCACCTAGGGAAAGGCTTC, (Seq. Id. Nr. 3) und

SREBP-2, Exon 10: CTGCTGCCGGCAACCTACA (Seq. Id. Nr. 7).

Diese Sequenzen können als solche oder zusammen mit weiteren Nukleotiden aus ihrer natürlichen Nachbarschaft als z.B. Sonde eingesetzt werden. Daneben gibt es aber auch weitere geeignete Sequenzen, wie die folgende Nukleinsäure-Sequenz, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleotiden aus der natürlichen Nachbarschaft dieser Sequenz, nämlich

10 SREBP-2, Exon 6: CTGAAGAAG.

Ein bevorzugtes Verfahren auf Ebene der Nukleinsäuren ist dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme und DNA-Extraktion mindestens ein Teilstück einer Sequenz, insbesondere eines Exons, eines
15 SREBP, das einen Polymorphismus enthält, unter Verwendung zweier Oligonukleotidsequenzen amplifiziert wird, wobei der Polymorphismus charakteristisch ist für eine erhöhte oder erniedrigte Aktivierung von Genen im Lipidstoffwechsel insbesondere im Cholesterinstoffwechsel, und speziell
20 bevorzugt für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholesterinämie beim Menschen, und dass das Produkt der Amplifikation einer Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder einer Denaturierung unterworfen wird und dass die Verdauungs- resp. Denaturierungsprodukte
25 elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Falls der Polymorphismus in einem Exon liegt ist vorzugsweise mindestens eine der Oligonukleotidsequenzen im Intronbereich angesiedelt, der dem Exon benachbart ist, in dem der Polymorphismus existiert, wie
30 beispielsweise die Paare

S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9):

5'-TTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' und

S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10):

5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

35 **EcoR I.S1.18cF** (Seq. Id. Nr. 11):

5'- CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC -3' und

EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12):

5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13):

5'-GCCAGTGACCATTAAACACCTTTTGA-3' und

5 **S2.10P.R.** (Seq. Id. Nr. 14):

5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' oder

EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15):

5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAAACACCTTTTGA-3' und

EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16):

10 5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3'

EcoRI S2.6F (Seq. Id. Nr. 17):

5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTTCACTCATC-3'

EcoRI S2.6R (Seq. Id. Nr. 18):

5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3'.

15 Neben den oben angegebenen Sequenzen resp. Sequenzpaaren sind auch andere Sequenzen resp. Sequenzpaare verwendbar, wie mit den oben angegebenen Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierbare Sequenzen, einschliesslich Sequenzen ohne resp. mit anderen Erkennungssequenzen als der oben angegebenen EcoRI-Sequenz.
20 Die Gesamtlänge solcher Sequenzen beträgt üblicherweise 15 bis 30 Basen.

Geeignete Polymorphismen können ermittelt werden durch amplifizieren und analysieren einer interessierenden SREBP-Sequenz, Vergleich der Exon-Bereiche dieser interessierenden Sequenz mit den Exon-Bereichen der Sequenz des in einer Population am häufigsten auftretenden Typs des entsprechenden SREBP und Untersuchung der Sequenzen mit gefundenen Unterschieden auf Fehlfunktion,
30 wobei vorzugsweise die Unterschiede zu einer anderen Aminosäure und/oder insbesondere zu einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym führen. Eine solche Erkennungsstelle liegt vorzugsweise in einem Exon, sie kann aber auch in einem Intron liegen und beispielsweise zu einer
35 Spleissvariante führen.

Der grosse Einfluss der gefundenen Polymorphismen auf Krankheitsbilder beeinflussende Faktoren wird

in der Folge kurz anhand der häufiger auftretenden Polymorphismen A595G und G1028G diskutiert:

Die A595G Mutation im SREBP-2 Gen ist mit einer signifikanten Modifikation der gemittelten Plasmacholesterin-Konzentrationen assoziiert. Die der publizierte

5 cDNA Sequenz(12,15,16) entsprechende Aminosäurefolge wurde als Wildtyp definiert, obgleich - zumindest in dem vorliegend untersuchten Schweizer Bevölkerungskollektiv - die Sequenz, die Glycin an Position 595 kodiert, eine

10 viel höhere Prävalenz hatte als das publizierte Alanin an dieser Stelle. Ueber 93% aller Individuen waren heterozygote oder homozygote Träger der A595G Mutation. Beide Gene wurden aus einer cDNA-Bibliothek, abgeleitet von HeLa Zellen, die vom Karzinom einer afro-amerikanischen Frau

15 (Henriette Lacks) abstammen, sequenziert(17). Direkte Versuche mit HeLa Zellen zeigten Homozygotie hinsichtlich des nicht mutierten A595A Genotyps und legten die Annahme nahe, dass diese Person homozygote Trägerin des Wildtyp Allels war - ein Zustand, der jedoch nur bei 6.69% des

20 schweizerischen Bevölkerungskollektivs vorgefunden wurde. Die Beobachtung einer hohen Prävalenz der A595G Mutation, führte im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Annahme, dass der seltene Wildtyp in homozygoter Form (11) mit einer höheren Plasmacholesterinkonzentration assoziiert

25 sei, und die nicht mutierte Form (22) mit einer niedrigeren Konzentration, dass somit ein autosomal-rezessiver Effekt vorliegen könnte, weshalb die Allelkombinationen 11 und 12/22 miteinander verglichen wurden.

Das Kollektiv der eingeschlossenen Individuen

30 war heterogen hinsichtlich der Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen, die von 1.95 bis 22.65 mmol/L reichten. Dieser grosse Bereich erklärte sich durch den Einschluss von zufälligen Stichproben, aber auch ausgewählten Kollektiven, und folglich normocholesterinämischen und hypercholesterinämischen Individuen. Daher war es nicht

35 verwunderlich, dass ohne Stratifizierung des Kollektivs in zufällig/nicht zufällig ausgewählte oder in normocho-

lesterinämische/hypercholesterinämische Untergruppen, der Effekt zumindest eines der Polymorphismen, der des G1028G Polymorphismus, keine statistische Signifikanz erreichte ($P=0.0770$). Sobald jedoch diese Auswahlkriterien in die Berechnungen einbezogen wurden, war der Unterschied der G1028G Allelkombinationen 11/12 gegenüber 22 signifikant ($P=0.0164$). Ebenso verringerte sich bei der A595G Mutation die Wahrscheinlichkeit, dass Unterschiede in den Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen zwischen der Allelkombination 11 gegenüber 12/22 auf Zufall beruhten, von $P=0.0003$ (ungepaarter t-Test, keine Stratifizierung) auf $P<0.0001$ (Varianzanalyse = ANOVA, Stratifizierung).

Darüberhinaus waren bei beiden Polymorphismen die Assoziationen zwischen einer bestimmten Allelkombination und höheren Plasmacholesterin-Konzentrationen (Allelkombination 22 beim G1028G Polymorphismus, Allelkombination 11 beim A595G Polymorphismus; in Figur 3, E und F, schwarz dargestellt) in Anwesenheit des R158C ($\epsilon 2$ Phänotyp) Polymorphismus stärker und in Abwesenheit des C112R ($\epsilon 4$ Phänotyp) Polymorphismus im Apo E Gen schwächer. Es wurde gefunden, dass diese Gen-Gen Interaktionen die Assoziation des G1028G Polymorphismus (22 Allelkombination) mit höheren Plasmacholesterinkonzentrationen deutlich beeinflussen: nach Ausschluss der Träger der C112R Mutation war der Effekt der G1028G C \rightarrow G Mutation in homozygoter Form (22) hoch signifikant ($P=0.0002$).

Es konnte somit gezeigt werden, dass beide SREBP-Gene die Plasmacholesterin-Konzentrationen beim Menschen ähnlich den bekannten Effekten der beiden Polymorphismen im Apo E Gen (C112R und R158C), modifizieren. Desweiteren wurden Gen-Gen Interaktionen deutlich, wenn die SREBP-1 und -2 Genpolymorphismen mit den Polymorphismen im Apo E Gen korreliert wurden.

Bei 11.6% der Individuen mit sekundären Hyperlipoproteinämien waren die Plasma-triglyceridkonzentrationen erhöht. Ein Effekt erhöhter Triglyceridkonzentrationen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass,

wurden Individuen mit erhöhten Triglyceridkonzentrationen ausgeschlossen, die A595G Mutation eine signifikante Auswirkung auf männliche Individuen mit Diabetes mellitus zeigte ($P=0.0018$), dieser Effekt jedoch ausblieb, wenn
5 Individuen mit erhöhten Triglyceridkonzentrationen eingeschlossen wurden.

Die A595G Mutation im SREBP-2 Gen könnte sowohl eng mit einer anderen Mutation verbunden sein als auch die Spaltungsrate des Proteins direkt betreffen.
10 Exon 10, wo die A595G Mutation lokalisiert ist, gehört zwar nicht zum Teil des reifen Proteins, das in den Zellkern wandert. Trotzdem ist dieser Teil des Proteins insofern mit der Aktivität des Proteins verbunden, als er die Spaltungsvorgänge, die die SREBP-2 Vorläuferform aktivieren,
15 ren, beeinflusst.

Die Proteolyse wird durch ein Enzym eingeleitet, das eine hoch konservierte RXXL Sequenz der SREBP Vorläuferformen erkennt, welche in der hydrophilen Schleife lokalisiert ist. Durch einen ersten Proteolyse-
20 schritt werden die NH_2 -Terminus- und die COOH -Terminus-Domänen getrennt. Nach diesem ersten, Sterol-sensitiven Schritt wird das verbleibende, Membran-gebundene NH_2 -Terminus Fragment durch einen zweiten, Sterol-unabhängigen Schritt freigesetzt. Der zweite Proteolyseschnitt (site-
25 2) ist innerhalb der Membran-durchspannenden Region lokalisiert und wird durch das site-2 Enzym vermittelt. Der zweite Schritt erfolgt nur, wenn die site-1 Proteolyse stattgefunden hat. Eine Vorbedingung für die site-1 Proteolyse ist jedoch die Bildung eines Komplexes aus SREBP
30 und dem sogenannten SREBP Cleavage Activating Protein (SCAP). Bei Mangel von Sterolen in der Zelle bindet dieses Protein an die COOH -Terminus Domäne. Die Bildung des SREBP-SCAP Komplexes ist entscheidend für den site-1 Proteolyseschritt und abhängig von der Vollständigkeit der
35 COOH -Terminus Domänen von SREBP-2 und SCAP (18,19). Auf der Grundlage der vor kurzem von Sakai et al. (18) durchgeführten Experimente, der den COOH -Terminus Teil der

SREBP Vorläuferformen als regulatorische Einheit identifizierte, wirft die Mutation in dieser Domäne, die ein signifikantes Sinken der gemittelten Plasmacholesterinkonzentrationen verursacht, die Frage einer leicht vereinfachten Bildung des SREBP-SCAP Komplexes auf, wenn die A595G Mutation vorhanden ist.

Der Effekt des G1028G Polymorphismus scheint von den Gen-Gen Interaktionen mit dem Apo E Gen beeinflusst zu sein. Im Gegensatz zur G1028G Mutation im SREBP-1 Gen, hat die A595G Mutation im SREBP-2 Gen als Marker signifikante Auswirkungen auf die Plasmacholesterinkonzentrationen sowohl wenn das gesamte Kollektiv untersucht wird, als auch bei der Analyse der verschiedenen Untergruppen. Es ist wahrscheinlich, dass die Mutation ihre Wirkung zeigt, indem sie direkt den Spaltungsvorgang beeinflusst, der für die Sterol-abhängige Aktivierung von SREBP-2 verantwortlich ist.

Aus den obigen Ausführungen folgt, dass beide Gene die individuellen Plasmacholesterinkonzentrationen signifikant modifizieren. Obgleich viele Gene im intra- und extrazellulären Cholesterinstoffwechsel eine Rolle spielen, ist im Hinblick auf die Allgemeinbevölkerung bislang nur das Apo E Gen als modifizierendes Gen von grösserem Nutzen gewesen. Andere am Lipoproteinmetabolismus beteiligte Gene, wie etwa das LDL Rezeptorgen, das Apo B-100 Gen oder ein weiteres, unbekanntes Gen auf Chromosom 1p34.1-p32 könnten im mutierten Zustand deutliche Auswirkungen auf die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen haben. Jedoch sind diese Mutationen im Vergleich zu den Polymorphismen im Apo E- und den jetzt entdeckten Polymorphismen im SREBP-1 und SREBP-2 - Gen sehr selten. Selbst die R3'500Q Mutation, die mit einem von 209 betroffenen Individuen der Allgemeinbevölkerung (in der Schweiz) die höchste bisher beobachtete Prävalenz hat (2), tritt nicht häufig genug auf, um an diesem Polymorphismus den Einfluss eines bestimmten Gens auf den Chole-

sterin-stoffwechsel der Allgemeinbevölkerung zu untersuchen.

Die Verfahren und Polymorphismen der vorliegenden Erfindung sind somit sehr wertvolle Hilfsmittel
5 für die Früherkennung von Risikopatienten sowie für die Optimierung von Prophylaxe und Therapien. Ferner eignen sie sich als Targets für das Wirkstoffscreening, sowie die Beurteilung einer Therapie gegen eine Krankheit wie z.B. HIV. Der Wert der bevorzugten Polymorphismen dieser
10 Erfindung ist auch die Anwesenheit von Erkennungssequenzen in nächster Nähe des Polymorphismus. Diese Erkennungssequenzen sind in SREBP-1 die Erkennungssequenz für *Xmn* I , nämlich GAANNNTTC, , wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann, und in SREBP-2 die Erkennungssequenz
15 für *Msp* I, d.h. CCGG.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Erfassung von Risikoträgern sowie Hilfsmittel für dieses Verfahren, wie Oligonukleotid-Sequenzen zur Amplifizierung interessierender DNA-Abschnitte.

20 Ein bevorzugtes Verfahren zur Erfassung von Risikoträgern zeichnet sich aus durch die nachfolgend aufgeführten Schritte:

1. Blut- oder Gewebeentnahme
2. DNA-Extraktion
- 25 3. Amplifikation mit geeignetem Primer
4. Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder Denaturierung des PCR-Produktes
5. Elektrophoretische Auftrennung auf geeignetem Gel.
- 30

Über die Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen werden insbesondere die speziell interessierenden Polymorphismen nachgewiesen und über die Denaturierung (Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus = SSCP)
35 lassen sich daneben weitere Mutationen auffinden.

Eine bevorzugte Oligonukleotid-Sequenz zur Amplifizierung eines DNA-Abschnitts, der einem Exon-Bereich entspricht, in dem ein Polymorphismus existiert, ist dadurch gekennzeichnet, dass sie in einem Intronbereich angesiedelt ist, der dem Exon benachbart ist, in dem der Polymorphismus existiert und nahe der Exon/Intron Grenze liegt, oder im Exon selbst, sofern sich dadurch die Zahl der Schnittstellen vermindern lässt.

Bevorzugte Oligonukleotide für den SREBP-1 Polymorphismus sind die Oligonukleotide S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9): 5'-TTATTATATAA²CTGGGTTTGTGTC-3' und S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10): 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3', die auch die Erfassung von Spleiss-Mutationen gestatten, sowie Oligonukleotiden, die daneben zusätzliche EcoR I-Schnittstellen besitzen, wie EcoR I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11): 5'-CGGAATTCTGAAATTATTATATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12): 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3'. Um Exon 10 des SREBP-2-Gens inklusive dessen Exon-/Intron-Grenzen zu amplifizieren sind die Oligonukleotide S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13): 5'-GCCAGTGACCATTAAACACCTTTTGA-3' und S2.10P.R (Seq. Id. Nr. 14): 5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' resp. EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15): 5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAAACCTTTTGA-3' und EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16): 5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3' bevorzugt.

Eine spezielle Verwendung von SREBP- Polymorphismen betrifft deren Einsatz auf sogenannten DNA- oder Gen-Chips. Verfahren unter Verwendung solcher Chips, die die gleichzeitige Erkennung verschiedener Gendefekte ermöglichen, sind in der Literatur beschrieben. So existiert Informationsmaterial der Firma Affymetrix zu deren GeneChipTM-Systemen, aber auch Artikel in Fachzeitschriften wie jene von Mark Chee et al., *Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays*, Science Vol. 274, Seiten 610-4, (1996) und David G. Wang, *Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide*

Polymorphisms in the Human Genome, Science Vol. 280, Seiten 1077-82, (1998).

Das Verfahren lässt sich kurz wie folgt zusammenfassen: Mittels Photolithographie werden gezielte Bereiche eines Wafers Schritt für Schritt der chemischen DNA- oder RNA-Einzelstrang-Synthese zugeführt, wobei der Schutzfilm nach jedem Syntheseschritt neu angebracht und anschliessend selektiv nur an denjenigen Stellen entfernt wird, an denen ein bestimmtes Nukleotid eingeführt werden soll. Durch dieses Vorgehen lassen sich Bereiche herstellen, die selektiv für bestimmte Polymorphismen sind. Zur Sichtbarmachung von Hybridisierungen mit Zielsequenzen können übliche Markierungen verwendet werden, z.B. licht-emittierende Markierung der in der Probe vorhandenen Fragmente, wie z.B. Biotinylierung und Detektion mit Streptavidin oder auch Fluoreszenzmarkierung.

Durch Entfernen markierter, nicht hybridisierender Fragmente werden Hybridisierungen auf dem Chip direkt oder nach einer weiteren Behandlung sichtbar. Selbstverständlich können die einzelnen Schritte dieses Verfahrens variiert werden, z.B. was den Zeitpunkt der Markierung oder die Art der Markierung anbelangt. Solche Variationen sind für den Fachmann erkennbar.

Ein Chip, der für die Früherkennung von Patienten mit einem erhöhten Risiko an Hypercholesterinämie geeignet ist weist neben den normalen SREBP-1- und SREBP-2-Sequenzen die entsprechenden Polymorphismen auf, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind. Neben diesen SREBP-1- und SREBP-2-Analysemitteln können selbstverständlich auch entsprechende Sequenzen für die weiteren Polymorphismen vorhanden sein, die für Hypercholesterinämie charakteristisch sind, d.h. FH, FDB und FDL.

Selbstverständlich kann ein entsprechender Chip auch zur Diagnose anderer Krankheiten bestimmt werden, die eine Abhängigkeit von SREBP-1 und/oder -2 zeigen, wie Alzheimer-Krankheit, oder er kann zur gleichzeitigen Diagnose mehrerer Krankheiten oder Risikofakto-

ren gestaltet werden, indem darauf für die interessierenden Krankheiten oder Risiken charakteristische Polymorphismen angebracht werden. Diesbezüglich interessante Sequenzen sind beispielsweise für das Studium kardiovaskulärer Risiken Sequenzen aus der folgenden Gruppe (bevorzugte Sequenzen unterstrichen):

- 11 β -Hydroxylase Aldosteron-Synthase Gen, 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD11K)Gen, 17 α -Hydroxylase (CYP17A)Gen, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG)Coenzym A
 10 Reduktase Gen, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG)Coenzym A Synthase Gen, Acyl Coenzym A:diacylglycerol acyltransferase Gen, Acyl-Coenzym A:cholesterol acyltransferase (ACAT)-1 Gen, Alpha-1-Antichymotrypsin Gen, Alpha-1-trypsin Gen, Alpha-Glaktosidase A Gen, Alpha-L-Iduronidase
 15 (IDUA) Gen, Alpha-Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) Gen, Alpha-Synuclein Gen, Angiotensin Gen, Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Gen, Angiotensin-converting Enzym Gen, Antitrypsin Gen, Apolipoprotein (a) Gen, Apolipoprotein AI-CIII-AIV Gen cluster, Apolipoprotein B-100
 20 Gen, Apolipoprotein CI Gen, Apolipoprotein E (epsilon 2), Apolipoprotein E (epsilon 4), Apolipoprotein E Gen, Apolipoprotein E Rezeptor 2 Gen, Benzodiazepine Rezeptor Gen, CD-36 Gen, Cholesterol 24-Hydroxylase Gen, Cholesteryl ester transfer Protein (CETP) Gen, Cystathionin- β -
 25 Synthase Gen, Cystatin C Gen, Cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage Enzym Gen, Epithelialer Na⁺-Kanal (β -Untereinheit) Gen, Farnesyl-Pyrophosphate (PP) Synthase Gen, Fibrinogen Gen, Glucokinase Gen, GLUT1 Glukose
 30 Transporter Gen, Hepatische Lipase Gen, High density lipoprotein (HDL) Rezeptor Gen, Homogentisinsäure-Oxidase Gen, Hormone-sensitive Lipase Gen, Iduronat-2-Sulfatase Gen, Interleukin-8 Gen, Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) Gen, Lipooxygenase Gen, Lipoprotein Lipase
 35 Gen, Low density lipoprotein receptor-related Protein (LRP) Gen, Low density lipoprotein Rezeptor Gen, Lysosomale saure Lipase Gen, Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-A) Gen, Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-BI) Gen,

Methylene-tetrahydrofolate Reduktase Gen, Microsomal
triglyceride transfer Protein (MTP) Gen, NF- κ B Gen, Nie-
mann-Pick C1 Protein Gen, Oxysterol binding Protein
(OSBP) Gen, Paraoxonase-1 Gen, Paraoxonase-2 Gen, Peroxi-
5 some proliferator-activated receptor (PPAR) alpha Gen,
Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta
Gen, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)
gamma Gen, Plasminogen activator-inhibitor-1 Gen, Site-1
Protein (S1P) Gen, Site-2 Protein (S2P) Gen, Squalene
10 Synthase Gen, SREBP cleavage-activating Protein (SCAP)
Gen, Steroid acute regulatory Protein (StAR) Gen, Stero-
id-11 β -Hydroxylase (CYP11B1) Gen, Sterol-27-Hydroxylase
Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a
Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c
15 Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-2
Gen, Very low density lipoprotein (VLDL) Rezeptor Gen.

Für das Studium neurologischer Risiken ist
 beispielsweise ein Chip umfassend Sequenzen aus der nach-
 folgend aufgeführten Gruppe günstig (bevorzugte Sequenzen
 20 unterstrichen):

A-beta precursor Gen, Adenosin monophosphate
 deaminase Gen, Alpha 2-monoglobulin Gen, Alpha-1-Antichy-
motrypsin Gen, Alpha-1-trypsin Gen, Alpha-2 Macroglobulin
Gen, Alpha-ketoglyterate dehydrogenase Gen, Amyloid beta-
25 protein precursor Gen, Amyloid precursor Protein Gen,
Amyloid precursor-like Protein 1 Gen, Amyloid precursor-
like Protein 2 Gen, Antitrypsin Gen, Apolipoprotein (a)
Gen, Apolipoprotein AI-CIII-AIV Gen cluster, Apolipoprotein
E (epsilon 2), Apolipoprotein E (epsilon 4), Apolipoppro-
30 tein E Gen, Apolipoprotein E Rezeptor 2 Gen, Bcl-2 Gen,
Beta-amyloid precursor Protein Gen, Beta-nerve growth
factor Gen, Calbindin-D Gen, Captase Gen, Cathepsin D
Gen, CD36 Gen, Clusterin Gen, Cyclooxygenase-2 Gen, Cy-
statin C Gen, Cytochrome C Oxidase 1 Gen, Cytochrome C
35 Oxidase 2 Gen, Cytochrome Oxidase Gen, Dihydrofolate Re-
duktase Gen, Dihydrolipoylsuccinyltransferase (DLST) Gen,
Endopeptidase 1 Gen, Estrogen-Bcl xL Gen, Fe65L2 Gen,

Gamma-synuclein Gen, Gelsolin Gen, GLUT1 Glukose Trans-
porter Gen, GLUT4 Glukose Transporter Gen, Glutaminsäure
Decarboxylase Gen, Glutathion S-transferase Gen, HLA-A2
Gen, Interleukin-1 Gen, Interleukin-6 Gen, Interleukin-8
5 Gen, L-3-Hydroxyacyl-Coenzym A Dehydrogenase Gen, Li-
pooxygenase Gen, Low density lipoprotein receptor-related
Protein (LRP) Gen, Low density lipoprotein Rezeptor Gen,
Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-A) Gen, Makrophagen
Scavenger Rezeptor (SR-BI) Gen, Methylene-tetrahydrofo-
10 late Reduktase Gen, Myeloperoxidase Gen, NF- κ B Gen, Nie-
mann-Pick C1 Protein Gen, Non-A-beta component for amy-
loid (NAC) peptide Gen, Notch Gen, Ornithine transcar-
bamylase Gen, Presenilin 1 Gen, Presenilin 2 Gen, Prion
Protein Gen (PRNP) Gen, Prostaglandin E2 Gen, Serotonin
15 Gen, Serotonin Transporter Gen, Site-1 Protein (S1P) Gen,
Site-2 Protein (S2P) Gen, SREBP cleavage-activating Pro-
tein (SCAP) Gen, Sterol regulatory element-binding pro-
tein (SREBP)-1a Gen, Sterol regulatory element-binding
protein (SREBP)-1c Gen, Sterol regulatory element-binding
20 protein (SREBP)-2 Gen, Superoxid dismutase gene Gen, Tau
(Protein) Gen, Very low density lipoprotein (VLDL) Rezep-
tor Gen, X11alpha Protein Gen, X11L2 Gen.

Ferner sind die Polymorphismen, Verfahren und
Chips der vorliegenden Erfindung auch geeignet um anfäl-
25 lige Risikopatienten für die Behandlung mit speziellen
Medikamenten zu ermitteln, wie eine Behandlung mit Pro-
tease-Hemmern bei HIV-Infizierten.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von
Beispielen näher erläutert. Die Erfindung ist aber nicht
30 auf die im experimentellen Teil beschriebenen Beispiele,
resp. die darin explizit genannten Ausführungsformen, be-
schränkt.

Experimenteller Teil

Vorbemerkungen

5 Die Polymorphismen wurden ermittelt, indem Oligonukleotide zu Intronsequenzen im Exon/Intron-Grenzbereich synthetisiert wurden, so dass auch allfällige Spleissvarianten erfasst werden konnten. In der Folge wird das genaue Vorgehen bei der Detektion der vorliegend
10 relevanten Polymorphismen sowie deren Untersuchung im Detail beschrieben.

Probanden

15 Es wurden insgesamt 3'078 Personen in die Studie aufgenommen. DNA Polymorphismen und seltene Mutationen in fünf verschiedenen Genen wurden untersucht. In allen Personengruppen wurden Individuen mit TC Plasmakonzentrationen unter der 90. Percentile, standardisiert für
20 Alter und Geschlecht, als normocholesterinämisch (NC) bezeichnet; Individuen mit TC Plasmakonzentrationen über der 90. Percentile als hypercholesterinämisch (HC). 1'685 Probanden aus verschiedenen prospektiv untersuchten Zufallsstichproben wurden eingeschlossen. 630 Individuen
25 waren aus der "Swiss PREvalence for Apolipoprotein Defects" (SPREAD) Studie, einer grossen Querschnittsuntersuchung, die unverwandte, männliche Individuen aus den deutsch-, französisch- und romanischsprachigen Teilen der Schweiz einschloss, die für den Militärdienst rekrutiert
30 wurden. Weitere 324 Individuen wurden von der Interdisziplinären Altersstudie (IDA) eingeschlossen. Weitere 413 ältere Individuen wurden eingeschlossen, die aufgrund einer vermuteten Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktion untersucht wurden, aber nicht aufgrund einer Hypercholesterinämie. Diese Individuen aus der Basler Memory Clinic
35 (BMC) wurden als weiteres Kontrollkollektiv in die Studie aufgenommen. 318 betroffene und/oder nicht betroffene In-

dividuen wurden von der "Study to Investigate the Molecular Basis of Hypercholesterolemia in Switzerland in Hyperlipidemic Individuals by Pedigree Analysis" (SIBSHIP), einer Unterstudie des schweizerischen MED PED (Make Early
5 Diagnosis - Prevent Early Death)-Programms, eine multinationalen Studie unter der Schirmherrschaft der WHO, in die Studie aufgenommen. 871 Individuen wurden von Kollektiven mit vermuteten primären und sekundären Hyperlipoproteinämien eingeschlossen. Die molekulare Diagnose be-
10 ruhte auf der Identifikation der zugrundeliegenden Mutation (familiär-defektives Apo B (FDB), familiäre Dysbetalipoproteinämie (FDL), familiäre Hypercholesterinämie, molekular diagnostiziert (FHM) oder mittels Kosegregations-Analyse (FHM)). Die klinische Diagnose von familiären Formen der Hypercholesterinämie beruhte auf Gesamt-
15 und/oder LDL-Cholesterinwerten oberhalb der 90. Percentile und einer Familienanamnese mit mindestens zwei weiteren Familienmitgliedern mit Hypercholesterinämie. Individuen mit Familien mit diesen Merkmalen und Triglyzerid-
20 werten < 3.7 mmol/L und/oder Sehnenxanthomen wurden als familiäre Hypercholesterinämie, klinisch diagnostiziert, klassifiziert (FHC). Familien mit Individuen ohne Xanthome sowie Triglyzeridwerten ≥ 3.7 mmol/L wurden als familiär-kombinierte Hyperlipidämie (FCH) bezeichnet.
25 Insgesamt 298 Personen stammten aus der "Study on the molecular basis of Triggers Activating a Rise in Triglycerides and cholesterol in Endocrinological and Renal Diseases" (STARTER). Ein Kollektiv von 130 Personen mit biochemisch bestätigtem Diabetes mellitus (Nüchtern-
30 Plasma-Glukosewerte > 7.8 mmol/L) (DIA), 78 Individuen mit Hypothyreose und 14 Individuen mit Niereninsuffizienz (Kreatinin Clearance < 50 ml/min) (RIN) wurden in die Studie eingeschlossen. Bei allen Personen wurden mindestens Alter, Geschlecht und Gesamtcholesterinkonzentrationen
35 ohne lipidsenkende Behandlung und die klinische bzw. molekularbiologische Diagnose erfasst. Mit Ausnahme der SPREAD Studie wurden die Personen zusätzlich ausführlich

klinisch charakterisiert. In der IDA, BMC, SIBSHIP und STARTER Studie wurden Grösse, Gewicht, Body-Mass-Index, Blutdruck, das Vorhandensein oder Fehlen von klinischen Anzeichen der Hypercholesterinämie (Sehnenxanthome, Xanthelasmen und Arcus lipoides) und Zeichen und Symptome von koronarer Herzkrankheit, zerebrovaskulären Erkrankungen und peripher-arterieller Verschlusskrankheit, sowie biochemische Parameter wie Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride und Schilddrüsen-stimulierendes Hormon (TSH) bestimmt. Die Dokumentation beinhaltete auch die persönliche Anamnese einer koronaren Herzkrankheit, einer zerebrovaskulären Erkrankung, einer peripher-arteriellen Verschlusskrankheit, einer Schilddrüsenerkrankung, eines Diabetes mellitus, das Ausmass von Alkohol- und Zigarettenkonsum (in pack years) und, in den SIBSHIP- und STARTER-Studien, eine ausführliche Familiengeschichte mit zusätzlichen Lipoproteinanalysen (z.B. Lipoprotein (a) [Lp(a)], Apolipoprotein B etc.). Bei allen diesen Personen wurden die Proben für die weiteren Tests anonymisiert.

Material

25

Es wurden *Thermus aquaticus* DNA Polymerase und Desoxynukleotide von Perkin Elmer Cetus Corporation (Norwalk, CT, USA) und von Qiagen (Milden, Deutschland) verwendet. Die Restriktionsendonukleasen waren von New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA) und vorgefärbte Protein-Molekulargewichts-Marker und DNA-Molekulargewichts-Marker von Roche Diagnostics (Basel, Schweiz). Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Microsynth Inc. (Balgach, Schweiz) synthetisiert. Die DNA wurde in 200 µl Reaktionsgefässen mittels PCR Maschinen von Perkin Elmer (GeneAmp® PCR-System 9700) und Stratagene (RoboCycler® Gradient 96 temperature cycler, Stratagene,

La Jolla, CA, USA) amplifiziert. Es wurde Agarose von BioRad (Irvines, CA, USA) und Polyacrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid 37.5:1) von Oncor Inc. (Gaithersburg, MD, USA) verwendet. Vorgegossene GMATM Wide Mini S-50 Gele und Spreadex EL 300 Wide Mini S-100 Gele wurden von Elchrom Scientific (Cham, Schweiz) gekauft. Vorgegossene Gele für die Polyacrylamidgelelektrophorese (Ready Gels 10%) waren von BioRad. [α -³²P] dCTP und Hybond-C Extra-Nitrozellulose-Membranen waren von Amersham International (Buckinghamshire, UK). DH5 α Bakterien und 1kb-DNA-Leitern waren von GIBCO BRL, Life Technologies (Paisley, UK); QIAmp 96 DNA blood-Kits, Genomic tip-Kits, QIAquick Extraktions- und PCR Purifikations-Kits, QIAprep Spin Miniprep-Kits und QIAGEN Plasmid Midi-Kits waren von Qiagen.

15

Methoden

Die in die Studie eingeschlossenen Individuen wurden für zwei bekannte DNA-Polymorphismen im Apolipoprotein E-Gen, die beide einen Aminosäurenaustausch bewirken (C112R, R158C), eine in der Schweizer Bevölkerung mit hoher Prävalenz vorkommende DNA-Mutation im Apolipoprotein B-100 Gen, die einen Aminosäurenaustausch (R3'500Q) verursacht, für einen neuen DNA-Polymorphismus im SREBP-1-Gen (G1028G), der zu keinem Aminosäureaustausch führt, und für einen neuen Polymorphismus im SREBP-2-Gen, der zu einem Aminosäureaustausch (A595G) führt, getestet. Eine Untergruppe dieser Personen, bei denen weitere Familienmitglieder mit Hypercholesterinämie untersucht wurden (SIPSHIP Studie), wurde auf das Vorhandensein von DNA-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen im LDL-Rezeptor-Gen untersucht, was die Durchführung von Kosegregationsstudien zur Bestätigung von LDL-Rezeptordefekten erlaubte. Individuen aus der SIPSHIP Studie wurden zusätzlich systematisch für Mutationen im LDLR-Gen getestet.

1. Lipoprotein Analysen

Nüchtern-Blutproben wurden von allen Personen, die in die Studie eingeschlossen wurden, abgenommen.

5 Lipid- und Lipoproteinanalysen wurden am Zentrallaboratorium der Universitätskliniken Basel durchgeführt, mit Ausnahme einer Untergruppe aus der SIPSHIP Studie mit familiären Formen von Hyperlipoproteinämien, die bei Studieneintritt bereits behandelt waren und bei denen eine

10 Auswaschperiode aufgrund ethischer Überlegungen nicht durchgeführt wurde. In dieser Untergruppe von Patienten wurden die Gesamtcholesterinkonzentrationen im Zentrallabor vor Beginn der medikamentösen Behandlung (pretreatment TC) bestimmt, oder die teilweise in anderen Laboratorien bestimmten Gesamtcholesterinkonzentrationen vor

15 Behandlung wurden von ihren behandelnden Hausärzten erfragt und in die Analyse aufgenommen. LDL-Cholesterin (LDLC) wurde mittels Heparin präzipitiert (Merck, Darmstadt, Deutschland) und mit Hilfe der Friedewald-Formel

20 errechnet. HDL-Cholesterin (HDL) wurde präzipitiert mittels Phosphor-Wolfram-Säure und Magnesium-Ionen (Roche Diagnostics). Gesamtcholesterin (TC), LDLC und HDLC Plasmakonzentrationen wurden mittels der enzymatischen kolorimetrischen Cholesterin 4-Aminophenazon (PAP) - Methode

25 von Roche Diagnostics auf einem Hitachi analyzer, Modell 737, gemessen.

2. DNA-Extraktionsmethode

30

Genomische Gesamt-DNA der in die Studie eingeschlossenen Personen wurde aus weissen Blutzellen mit Hilfe der Aussalzmethode(1), mit den früher beschriebenen Modifikationen(2), oder mittels der QIAmpTM 96 DNA blood-

35 Kits von Qiagen extrahiert.

3. Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus (SSCP)

a) Radioaktive Methode

5

Um LDL-Rezeptorgen-Mutationen nachzuweisen wurden alle 18 Exons des LDL-Rezeptor-Gens mittels der von Hobbs et al. (3) publizierten Oligonukleotide amplifiziert.

10

Zur Vervielfältigung von Exon 18c des SREBP-1-Gens inklusive der Exon-/Intron-Grenzen, um auch Spleiss-Mutationen zu entdecken, wurde das folgende Paar von Oligonukleotiden verwendet: S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9): 5'-TTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10): 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAGTTGTG-3'. Um Exon 10 des

15

SREBP-2-Gens inklusive dessen Exon-/Intron-Grenzen zu amplifizieren wurden die Oligonukleotide *EcoRI* S2.10F (Seq. Id. Nr. 15): 5'-CGGAATTCTGCCAGTGACCATTAAACACCTTTTGA-3' und *EcoRI* S2.10R (Seq. Id. Nr. 16): 5'-

20

CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3' verwendet. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 6 µl in 1x PCR Puffer (Perkin Elmer) unter Verwendung von 1.0 U *Taq* Polymerase (Qiagen), 74 kBq [α -³²P] dCTP (Amersham) mit einer Endkonzentration von 1.5 mM MgCl₂, 420 µM jeder der vier dNTP (Qiagen) und 8.3 µM jeder der beiden Oligonukleotide durchgeführt.

25

Für SSCP des LDL-Rezeptor-Gens wurde genomische DNA (200ng) unter den folgenden PCR Bedingungen amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 45 Sek.; 30 58°C, 30 Sek.; 72°C, 120 Sek. (29 Zyklen). Für SSCP der SREBP-1 und SREBP-2 Gene wurden 200ng genomischer DNA wie folgt PCR amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 60 Sek. (30 Zyklen). Anschließend an die PCR wurden 25 µl Denaturierungs-Puffer 35 (95 % Formamid, 0.05 % Bromphenolblau, 0.05 % Xylencyanol, 20 mM EDTA) der PCR Mischung zugegeben. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 95°C wurden 6 µl der Mischung auf

ein 7 % Polyacrylamidgel (Acrylamid: Bisacrylamid Mischung 37.5:1), 2x TBE, 1.37 M Glyzerol, Geldicke 0.75 mm) geladen und das Gel wurde in 1x TBE Puffer bei 4°C in einem Kühlraum oder bei Raumtemperatur bei 15-20 V/cm für
5 12-16 Stunden laufen gelassen. Danach wurde das Gel mit Hilfe eines Vakuumtrockners bei 80°C eine Stunde lang getrocknet und Kodak X-OMAT AR Filme wurden bei Raumtemperatur 3-36 Stunden belichtet.

10

b) Nicht-radioaktive Methode

Zur nicht-radioaktiven Identifizierung von Sequenzvariationen in Exon 10 des SREBP-2 Gens inklusive
15 seiner Exon-/Intron-Grenzen wurden die Oligonukleotide *EcoR* I S2.10F und *EcoR* I S2.10R verwendet. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 11 µl in 1x PCR Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 1.0 U *Taq* Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 1.5 mM MgCl₂, 909 µM jeder der
20 vier dNTP (Qiagen), und 4.6 µM jeder der beiden Oligonukleotide durchgeführt. Genomische DNA (100ng) wurde unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 58°C, 30 Sek; 72°C, 60 Sek. (29 Zyklen). Anschliessend an die PCR wurden 25 µl Denaturie-
25 rungs- bzw. Lade-Puffer (97 % Formamid, 0.05 % Bromphenolblau; 0.05 % Xylencyanol, 10mM NaOH) der PCR Mischung zugegeben. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 92°C und sofortiger Abkühlung auf Eis für 10 Minuten wurden 6 µl der Mischung auf Elchrom GMA Wide Mini S-50 Gele geladen und
30 mit 1x TAE Puffer (Puffer Temperatur 9°C) bei 6 V/cm in einer Elchrom Sea 2000 Elektrophorese Kammer für 14 Stunden laufen gelassen. Nach Entfernung des Stützplastiks wurde das Gel 40 Minuten lang in 50 ml SYBR® Gold (Arbeitslösung nach Angaben des Herstellers Molecular Probes) in 0.75 x Standard TAE Puffer (4) auf einem Schüttler
35 gefärbt. Nach 40-minütiger Entfärbung in 100 ml destilliertem Wasser auf einer Schüttelmaschine wurde das

Gel analysiert mittels 302 nm UV Durchleuchtung und unter Verwendung eines Gel Doc 1000 Systems von BioRad digitalisiert.

5

4. Sequenzierung von LDL-Rezeptor-Gen-Mutationen und SREBP-1, Exon 18c, und SREBP-2, Exon 10, - Mutationen

Die entdeckten Sequenzvariationen wurden weiter analysiert mittels Subklonierung amplifizierter Exone und anschliessender Sequenzierung des Inserts. Beim LDL-Rezeptor-Gen wurde die PCR-Amplifizierung der entsprechenden Exone mittels der oben beschriebenen Oligonukleotide durchgeführt (3). Im SREBP-1-Gen wurde die PCR-Amplifikation des Exon 18c mittels Oligonukleotiden, die zusätzliche *EcoR* I-Schnittstellen besaßen, durchgeführt; *EcoR* I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11): 5'-CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC -3' und *EcoR* I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12): 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3'. Im SREBP-2 Gen wurde die PCR Amplifikation des Exon 10 mittels *EcoR* I S2.10F: und *EcoR* I S2.10R: durchgeführt.

Die Amplifikationsreaktionen wurden in einem Endvolumen von 50 µl mit 1x PCR Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 2.5 U *Taq* Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 1.5 mM $MgCl_2$, 500 µM jeder der dNTP (Qiagen) und 2.0 µM jeder der beiden Oligonukleotide ausgeführt. Die folgenden Temperaturen wurden mittels eines Robocyclers erreicht: 95°C, 45 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 45 Sek. (30 Zyklen). Die amplifizierten Fragmente (50 µl) wurden auf ein 1 % Agarosegel, das 0.6 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, geladen, ausgeschnitten und mittels des QIAquick™ Extraktions-Kits (Qiagen) gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit 20 U *EcoR* I für mindestens 3 Stunden verdaut und mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purifikations-Kits gereinigt. Der Vektor pcDNA 3.1 His A (3-5 µg) wurde mit 40 U *EcoR* I für drei Stunden verdaut. Im Anschluss

5 daran wurden 20 U Kalb-Intestinal-Peptid (Roche Diagnostics) dazugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Vektor wurde mit dem QIAquick™ PCR Purifikations-Kit gereinigt und mit 50 µl Wasser eluiert. Die Ligation wurde
10 mittels des Ligations-Kits von Takara durchgeführt. Das gereinigte PCR Produkt (4 µl) und der gereinigte pcDNA3.1 His A Vektor (1 µl) wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers ligiert und in *E.Coli* DH5α Bakterien (Life Technologies) mittels der Hitzeschockmethode
15 (42°C für 45 Sek.) transformiert. Von Personen mit dem Wildtyp, gemäss den SSCP Resultaten, und von Personen mit der Sequenzvariation wurden 5-7 Kolonien ausgewählt und in 10 µl Wasser resuspendiert. Die Genotypisierung zur Festlegung des Vorhandenseins der Sequenzvariation wurde
20 mit 2 µl der Bakteriensuspension und SSCP-Methoden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Unabhängige Klone jeder der zwei Zustände (Wildtyp/Mutation) aus zwei unabhängigen PCR wurden sequenziert. Die DNA-Sequenzierung wurde durch die Microsynth AG durchgeführt mittels der Dideoxy-Ketten-Terminations-Methode. Um die Klone zu expandieren wurden 5 µl der übriggebliebenen Suspension zu 3 ml LB Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von 1.5 ml der Bakterien-suspension wurde die Plasmid-DNA gereinigt unter Verwendung des QIAprep™ Spin Miniprep-Kits (Qiagen).
25

5. Test auf Apolipoprotein E-Mutationen, die die Plasmacholesterin-konzentration beeinflussen

30

Die beiden häufigen Apolipoprotein E Aminosäurepolymorphismen C112R und R158C wurden mittels PCR Amplifikation und anschliessender Verdauung mit *Hha* I bzw. des Isoschizomers *Cfo* I nach dem Protokoll von Hixson und Vernier (5) identifiziert.
35

6. Test auf Apolipoprotein B-Mutationen, die die Plasmacholesterin-konzentration beeinflussen

Drei unterschiedliche molekularbiologische
5 Methoden wurden verwendet, um Mutationen zu suchen, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 3'500 des Apolipoprotein B-Gens führen. Proben von Personen aus der SREAD Studie (2) mit Gesamtcholesterinkonzentrationen \leq 4.5 mmol/L wurden gepoolt (25 Proben) und mittels der Me-
10 thoden von Ruzicka et al., 1992(6) und von Schuster et al.(7) auf Mutationen getestet. Personen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen $>$ 4.5 mmol/L und positive Pools aus der SPREAD Studie, als auch alle anderen Proben, die bis 1996 untersucht wurden, wurden einzeln mittels allelspe-
15 zifischer, asymmetrischer PCR, wie oben beschrieben (2), getestet. Von 1996 an wurde diese Methode durch eine site-directed Mutagenese-PCR-Technik, die eine *Msp* I Restriktionsschnittstelle bei Wildtypproben einführt, ersetzt. Die darauffolgende Verdauung mit *Msp* I(8) ermöglichte die Identifizierung von Patienten mit der R3'500Q
20 Mutation.

7. Methoden zur Identifikation der SREBP-1, Exon 18c, und SREBP-2, Exon 10, -Polymorphismen mittels Restriktionsenzymverdauung

Im SREBP-1 Gen wurde das gesamte Exon 18c mittels des Primerpaars S1.18cF und S1.18cR amplifiziert;
30 Exon 18c enthält den Polymorphismus, der eine variable *Xmn* I Schnittstelle generiert. Im SREBP-2 Gen wurde lediglich der 5' Teil des Exon 10 amplifiziert, der den Polymorphismus enthält, der eine variable *Msp* I Restriktionsschnittstelle generiert. Auf diese Weise wurde ver-
35 hindert, dass weitere *Msp* I-Schnittstellen amplifiziert wurden, und ein komplexes Restriktionsmuster wurde vermieden. Beim SREBP-2 Gen wurden die folgenden Oligonu-

kleotide verwendet: S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13):5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und S2.10P.R (Seq. Id. Nr. 14):5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3'.

Zur Darstellung des SREBP-1-Polymorphismus wurden 80 ng genomischer DNA von den untersuchten Personen unter den nachfolgenden PCR Bedingungen amplifiziert: 95°C, 240 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 55°C, 60 Sek.; 72°C, 90 Sek. (33 Zyklen). In einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden 2.0 µM von jedem der beiden Oligonukleotide, 400 µM jeder der dNTP (Qiagen), 1x PCR Puffer (1.5 mM MgCl₂ Endkonzentration, Perkin Elmer) und 0.6 U Taq Polymerase (Qiagen) gemischt. Vom nicht-gereinigten Amplikon wurden 20 µl in 1x NE Puffer mittels 16-32 U *Xmn* I (New England Laboratories), 0.2 µl 10mg/ml BSA und einer Inkubationstemperatur von 37°C für 5 Stunden verdaut.

Zur Darstellung des SREBP-2 Polymorphismus wurden ca. 100 ng genomischer DNA mittels PCR unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C, 30 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 90 Sek. (30 Zyklen). In einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden 1.37 µM von jedem der beiden Oligonukleotide, 390 µM jeder der dNTP (Qiagen), 1x PCR Puffer (1.5 mM MgCl₂ Endkonzentration, Perkin Elmer) und 0.75 U Taq Polymerase (Qiagen) gemischt. Vom resultierenden Amplikon wurden 20 µl in 1x NE Puffer mittels 16 U *Msp* I und einer Inkubationstemperatur von 37°C für 5 Stunden verdaut. Zur Identifikation der zwei Polymorphismen wurden 6-8 µl der verdauten Reaktionsgemische auf 10 % Polyacrylamid Ready Gele (BioRad) geladen und mit 1x TBE Puffer bei Raumtemperatur auf 18-22 V/cm für 25-35 Minuten laufen gelassen. Die Gele wurden daraufhin in einer 50 ml 0.5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung für 5 Minuten gefärbt und mittels eines Gel Doc 1000 Systems von BioRad bei einer Wellenlänge von 302 nm UV Licht digitalisiert.

8. Untersuchung auf LDL-Rezeptor-Mutationen als Ursache für erhöhte Plasmacholesterin-Konzentrationen

Bei einer Untergruppe von 48 Personen wurde
5 die klinische Diagnose einer familiären Hypercholesterinämie aufgrund eines LDL-Rezeptor Defektes bestätigt
mittels Kosegregationsstudien unter Verwendung von 10
verschiedenen RFLP im LDL-Rezeptorgen (9,10). Bei 110 von
insgesamt 446 Familien wurden alle Exone des LDL-
10 Rezeptorgens mittels SSCP (radioaktive Methode) und der
publizierten Oligonukleotide (3) untersucht. Bei 22 Familien wurde das Vorhandensein von LDL-Rezeptor Mutationen
durch Subklonieren und Sequenzieren von Exonen, die Sequenzvariationen aufwiesen, bestätigt.

15

9. Statistische Analyse: Populationsgenetik

Die Daten des Geneva Survey, einer Studie bei
20 Schulkindern (13) und Daten aus der Swiss MONICA Studie
(3,341 Individuen eingeschlossen (14)), wurden verwendet,
um alters- und geschlechtsspezifische 90-er Perzentilen
für Gesamtcholesterin und Triglyzeride in der Schweiz zu
generieren. Alle Berechnungen wurden auf Mackintosh G3
25 Computern unter Verwendung der FileMaker® Datenbank
CARDIOFILE, der StatView® und SuperANOVA® Programme ausgeführt.

Individuen mit Plasmacholesterin-
Konzentrationen unter der 90-er Perzentile wurden als
30 normocholesterinämisch (NC) bezeichnet, Individuen mit
Gesamtcholesterin-konzentrationen über der 90-er Perzentile
als hypercholesterinämisch (HC). Bei beiden Gruppen
wurde der Einfluss des Vorhandenseins der Apo E Mutationen
C112R, R158C, und der neuen Aminosäurepolymorphismen
35 im SREBP-2 Gen (A595G) und im SREBP-1 Gen (G1028G) mit
Hilfe multivariater Testverfahren bestimmt.

10. Auswertung der nach obigen Angaben erhaltenen Resultate

5 10.1 Assoziation zwischen Polymorphismen in den SREBP-1 und -2 Genen mit Plasma- cholesterinkonzentrationen

10 10.1.1. Nachweis von Mutationen in den SREBP-1 and -2 Genen mit PIC-Werten über 0.25

Ein Personenkollektiv wurde auf das Vorhandensein von Sequenzvariationen mittels der Einzelstrang-Konformation-Polymorphismus-Methode (SSCP) untersucht. Ziel war der Nachweis von Polymorphismen, deren Vorkommen eine Häufigkeit erreicht, dass populationsgenetische Untersuchungen vorgenommen werden können. Dazu wurde ein Polymorphismusinformationsgehalt (PIC) - Wert von über 0.25 festgelegt. Die zwei durch die Einzelstrang-Konformation-Polymorphismus-Methode nachgewiesenen Sequenzvariationen, die eine im Exon 18c des SREBP-1 Gens und die andere im Exon 10 des SREBP-2 Gens, erfüllen diese Bedingung und wurden deshalb weitergehend charakterisiert. Exon 18c des SREBP-1 Gens und Exon 10 des SREBP-2 Gens von Personen, die die entsprechenden, vom Wildtyp abweichenden SSCP - Muster aufwiesen, wurden amplifiziert. Diese Exonsequenzen wurden subkloniert und sequenziert.

30 Figur 1A zeigt das Chromatogramm einer Person, die Träger eines DNA Polymorphismus an Aminosäureposition 1028 im Exon 18c des SREBP-1 Gens (G1028G) ist. Figur 1B zeigt das Chromatogramm einer Person, bei der ein DNA Polymorphismus, der zu einem Aminosäureaustausch an Position 595 im SREBP-2 Gen führt (A595G), nachgewiesen wurde.

Im SREBP-1 Gen fand sich eine Basensubstitution C → G im Exon 18c. Diese Basensubstitution führt nicht zu einem Aminosäureaustausch, generiert aber eine *Xmn* I Restriktionsschnittstelle (Figur 1A). Im SREBP-2 Gen wurde eine Basensubstitution C → G entdeckt. Diese Basensubstitution führt zu einem Austausch von Alanin zu Glycin in der Aminosäuresequenz und generiert eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle *Msp* I (Figur 1).

Die entsprechenden PIC - Werte, die aus allen eingeschlossenen Personen mit Ausnahme der verwandten Individuen aus der SIBSHIP Studie (N=2'446) errechnet wurden, betrugen 0.368 für den SREBP-1-Genpolymorphismus und 0.300 für den SREBP-2- Genpolymorphismus. Um grössere Kollektive hinsichtlich dieser Polymorphismen screenen zu können, wurde für jeden der beiden Polymorphismen eine Methode entwickelt, die auf einer PCR Amplifikation des entsprechenden DNA Abschnitts und darauffolgender Restriktionsenzymverdauung beruht (Figur 2). Weder der G1028G Polymorphismus noch der A595G Polymorphismus wichen signifikant vom Hardy - Weinberg Gleichgewicht ab ($P > 0.70$ bzw. $P > 0.10$, wenn ein rezessiver Effekt zugrunde gelegt wurde). Bei HeLa Zellen wurde der G1028G Polymorphismus nur auf einem der beiden Allele entdeckt (heterozygot hinsichtlich des G1028G Polymorphismus (12)). Die A595G Mutation konnte bei HeLa Zellen nicht nachgewiesen werden (homozygot hinsichtlich des A595A Polymorphismus (11)).

10.1.2. Populationsgenetik

Insgesamt wurden 3'078 Individuen untersucht; 2600 Individuen, bei denen Gesamtcholesterinwerte ohne Behandlung gemessen wurden, wurden hinsichtlich der Mutationen und Polymorphismen in vier Genen getestet. Eine Untergruppe von 954 Personen setzte sich aus Zufallsstichproben von Querschnittsuntersuchungen zusammen

(SPREAD, IDA), 318 waren nicht verwandte Individuen aus der SIBSHIP Studie (eine nicht betroffene Person pro Familie und alle Ehegatten, Schwager und Schwägerinnen, die genetisch unverwandt waren (REL)). Insgesamt 871 Personen wurden aus Patientenkollektiven mit primären und sekundären Hyperlipoproteinämien eingeschlossen. Alle 3'078 Individuen der Patienten- und Kontrollkollektive wurden auf das Vorhandensein der Mutation im Apo B-100 Gen, die zu einem Aminosäureaustausch bei Position 3'500 führt, getestet, um Patienten mit FDB in Kontrollkollektiven und den Patientenkollektiven mit Hyperlipoproteinämien zu identifizieren. Um Patienten mit familiärer Dysbetalipoproteinämie zu identifizieren, wurden alle 3'078 Individuen auf das Vorhandensein der Mutation im Apo E Gen bei Aminosäureposition 158 (E2 Allel) sowie auf das Vorhandensein der Mutation bei Position 112 (E4 Allel) untersucht. Das Vorhandensein von LDL-Rezeptor-Gendefekten führt generell zu einem signifikanten, d.h. zwei- oder dreifachen Anstieg der Gesamtcholesterinkonzentrationen, weshalb nur Patienten mit primären Formen von Hyperlipoproteinämien und deutlich erhöhten Gesamtcholesterinkonzentrationen auf das Vorhandensein dieser Mutationen hin untersucht wurden. Tabelle 1 zeigt eine Uebersicht über die verschiedenen Patienten- und Kontrollkollektive. Personen aus den Kontrollgruppen, die nachweislich unter bestimmten Störungen litten, die zu primären bzw. sekundären Formen von Hyperlipoproteinämie führen, wurden ebenfalls in die Patientenkollektive mit der entsprechenden Störung eingeschlossen. Somit ist die Summe der Personen aller Untergruppen grösser als die Anzahl der Individuen insgesamt (N=2'600). Tabelle 1 stratifiziert die Patienten- und Kontrollkollektive nach Individuen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen unterhalb der 90er Perzentile (normocholesterinämisch, NC) und Individuen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen oberhalb der 90er Perzentile (hypercholesterinämisch, HC).

Die in Tabelle 1 aufgeführten Patienten- und Kontrollkollektive wurden auf das Vorhandensein des beschriebenen Polymorphismus getestet mittels der oben erläuterten Methoden (Screenen von Personenkollektiven mit hohem Durchsatz).

Drei weitere Gene wurden untersucht: das Apo E Gen (Aminosäurepolymorphismen C112R und R158C), das Apo B-100 Gen (Mutation bei Aminosäureposition 3'500, R3'500Q). Im LDL-Rezeptor-Gen wurden Mutationen, die zu familiärer Hypercholesterinämie führen, mittels SSCP, darauffolgender Amplifikation der entsprechenden Exone, in denen Sequenzvariationen gefunden wurden, Subklonieren und Sequenzieren, identifiziert.

Insgesamt 3'078 Individuen wurden auf das Vorhandensein der Aminosäuresubstitution im Apo B Gen getestet (R3'500Q), sowie auf das Vorhandensein von zwei Aminosäurepolymorphismen im Apo E Gen (C112R oder E4 Allel, R158C oder E2 Allel), von denen bekannt ist, dass alle drei Mutationen die Plasmacholesterinkonzentration modifizieren.

Ausserdem sind 2'600 Personen hinsichtlich eines neuen DNA Polymorphismus im SREBP-1 Gen (G1028G) untersucht worden, der als Marker benutzt wurde. Alle 3'078 Personen wurden hinsichtlich eines neuen DNA Polymorphismus im SREBP-2 Gen (A595G) getestet, der zu einem Aminosäureaustausch führt.

Bei diesen Personen wurden die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen gemessen. Von den 3'078 eingeschlossenen Personen nahmen 478 lipidsenkende Medikamente bei Studieneintritt; Gesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung standen nicht zur Verfügung, weshalb diese Personen von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Von den übrigen 2'600 Personen wurden dann, wie beschrieben, Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung, standardisiert für ein Alter von 50 Jahren, in die weitergehende Analyse aufgenommen. Tabelle 2 fasst die Resultate der Prävalenz der beiden Po-

lymorphismen in den entsprechenden Untergruppen der Patienten- und Kontrollkollektive sowie die gemittelten Gesamtcholesterinkonzentrationen der verschiedenen Untergruppen im Verhältnis zum Vorhandensein des Polymorphismus zusammen.

Insgesamt zeigte sich ein hoch signifikanter, cholesterinsenkender Effekt der A595G Mutation im SREBP-2 Gen (Tabelle 2, N=2'600; P=0.0005). Dieser Effekt war noch ausgeprägter, falls die homozygoten Träger der C112R Mutation im Apo E Gen (E4/E4) (N=107) von der Untersuchung ausgeschlossen wurden (N=2'493; P<0.0001). Verwendete man nur genetisch unverwandte Personen für die Untersuchung, schloss also verwandte Personen aus der SIBSHIP Studie aus, sank die Wahrscheinlichkeit noch mehr, dass der Unterschied auf Zufall basierte (N=2'446, P=0.0003). Figur 3 zeigt die Analyse des Kollektivs unverwandter Personen (N=2'446), welches sich aus allen Individuen mit Ausnahme der genetisch verwandten aus der SIBSHIP Studie zusammensetzte, nach Stratifizierung hinsichtlich verschiedener Kriterien. Figur 3A and B veranschaulichen den Effekt der G1028G und A595G Polymorphismen bei zufällig ausgewählten Individuen. Zufallsstichproben (als solche festgelegt) hinsichtlich Hypercholesterinämie waren die SPREAD und IDA Studien sowie die Kollektive unverwandter, nicht betroffener Individuen (REL), und Personen, die aufgrund von möglichen Beeinträchtigungen der Gedächtnisfunktion (MCS) ausgewählt wurden. Aufgrund des Vorhandenseins einer Hypercholesterinämie wurden die restlichen Kollektive ausgewählt (nicht zufällig). Mittels Varianzanalysen (ANOVA, Scheffé Test) konnte ein signifikanter Effekt für den G1028G Polymorphismus nachgewiesen werden, wenn das Kollektiv hinsichtlich der Auswahlgruppe (zufällig/nicht zufällig) stratifiziert wurde (P=0.0164). Ebenso konnte der Effekt in beiden Gruppen bezüglich der A595G Mutation gezeigt werden; ANOVA ergab eine Wahrscheinlichkeit, dass der Unterschied auf Zufall basierte, von P<0.0001. Figuren 3C

und D zeigen die Stratifizierung hinsichtlich der 90er
Percentile (NC, HC). Beim G1028G Polymorphismus ergab
sich ein signifikanter Effekt unter Anwendung von ANOVA
($P=0.0088$). Bei der A595G Mutation zeigte die Analyse
5 nach Berücksichtigung des zusätzlichen Faktors ebenfalls
eine Wahrscheinlichkeit von $P<0.0001$.

Ausserdem konnte der bekannte, cholesterinmo-
difizierende Effekt der Apo E Gen Polymorphismen C112R
($\epsilon 4$) und R158C ($\epsilon 2$) im getesteten Untersuchungskollektiv
10 gezeigt werden ($N=2'600$; $P<0.0001$).

Figuren 3, E und F, verdeutlichen die Gen -
Gen - Interaktionen zwischen Apo E und den SREBP-1 und -2
Genen. Wurden alle 2'600 Individuen in die Untersuchung
eingeschlossen, war kein signifikanter, cholesterinmodi-
15 fizierender Effekt des G1028G Polymorphismus im SREBP-1
Gen nachweisbar. Nach Einbeziehen der Effekte der Apo E
Gene in der Analyse, war für den G1028G Polymorphismus
der Unterschied zwischen der homozygoten Form des Poly-
morphismus (22) und den anderen zwei Allelen (11/12)
20 nicht signifikant (ANOVA, $P=0.0722$). Wurden jedoch homo-
zygote oder heterozygote Träger der Apo E C112R ($\epsilon 4$) Mu-
tation ausgeschlossen ($N=761$), war der Effekt des Fehlens
des Wildtyp - Allels auf die Plasmagesamtcholesterinkon-
zentrationen hoch signifikant ($N=1'839$; $P<0.0001$). Beim
25 A595G Polymorphismus war der Unterschied zwischen der ho-
mozygoten Form des Wildtyp (11) und der anderen beiden
Allele (12/22) schon hoch signifikant ($P=0.0002$) nach
Einbeziehen der Effekte der Apo E Gene in die Analyse.
Wenn homozygote oder heterozygote Träger der Apo E C112R
30 ($\epsilon 4$) Mutation ausgeschlossen wurden, sank die Wahrschein-
lichkeit eines auf Zufall beruhenden Effekts weiter
($P<0.0001$).

Eine weitere Stratifizierung der Kollektive
hinsichtlich der zugrunde liegenden Störungen, die entwe-
35 der eine primäre oder sekundäre Hypercholesterinämie ver-
ursachen, ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Resultate der
Häufigkeitsberechnungen der beiden Polymorphismen

(G1028G, A595G) entsprechend den verschiedenen Untergruppen finden sich in der ersten Zeile. Die Ergebnisse der gemittelten Gesamtcholesterinwerte ohne Behandlung in den verschiedenen Untergruppen, stratifiziert bezüglich des Vorhandenseins oder Fehlens der G1028G und A595G Polymorphismen, werden in der zweiten Zeile gezeigt (Tabelle 2). In den Untergruppen mit primären Hyperlipidämien hatte der Effekt der A595G Mutation statistische Relevanz in der Patientengruppe mit FDL ($P=0.0020$) und in der Patientengruppe mit primärer Hypercholesterinämie (PHC). Bei diesen Patienten waren Mutationen in den Apo E, Apo B und LDL Rezeptor Genen ausgeschlossen worden, obgleich ein autosomal-dominant oder -rezessiv vererbter Gendefekt als Ursache für Hypercholesterinämie vermutet wurde. In dem letztgenannten Kollektiv war die Prävalenz des Wildtyp (11) Allels signifikant höher (9.38%) als in der Summe der anderen Kollektive (6.69%) ($P=0.0328$).

Hinsichtlich der Kollektive mit sekundären Hyperlipoproteinämien (hierzu gehören sowohl als NC als auch als HC klassifizierte Personen), konnte bei Männern mit Diabetes mellitus und normalen Plasmatriglyceridkonzentrationen ($TG < 2.3 \text{ mmol/L}$) ein signifikanter Unterschied zwischen A595A (11) und A595G (12/22) positiven Individuen festgestellt werden ($P=0.0018$). Bei 11.6% der Individuen mit sekundären Hyperlipoproteinämien waren die Plasmatriglyceridkonzentrationen erhöht.

Im SREBP-1 Gen betrug die Prävalenz des Wildtyp Allels im homozygoten Zustand (11) 40.35%, die Prävalenz des G1028G Polymorphismus im heterozygoten Zustand (12) 45.62% und im homozygoten Zustand (22) 14.04% ($N=2'600$). Im SREBP-2 Gen war die Prävalenz des Wildtyps im homozygoten Zustand (11) 6.69%, die Prävalenz der A595G Mutation im heterozygoten Zustand (12) 35.15% und im homozygoten Zustand (22) 58.15% ($N=2'600$).

Um den Effekt der entdeckten DNA- und Aminosäurepolymorphismen auf die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen zu erklären, wurden 3'078 Individuen moleku-

largenetisch untersucht. Bei 2'600 Personen konnten sowohl demographische als auch klinische Daten ergänzt werden mit Angaben zu Alter, Geschlecht, Gesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung mit lipidsenkenden Medikamenten zum Zeitpunkt der Cholesterinbestimmung, Genotyp hinsichtlich des Apo E Aminosäurepolymorphismus (C112R oder ϵ 4 Allel, R158C oder ϵ 2 Allel), und zur Apo B100 Mutation, die zuerst als ursächlich für FDB (R3'500Q) entdeckt wurde. Der R158C Aminosäurepolymorphismus hat im

10 homozygoten Zustand einen cholesterinmodifizierenden Effekt in der untersuchten Population ($P < 0.0001$). Bei Personen, die Träger der R3'500Q Mutation (FDB) sind, waren die Gesamtcholesterinkonzentrationen erhöht im Vergleich zu Personen ohne Apo B Defekt ($P < 0.0001$). Bei Personen

15 mit nachgewiesenen LDL Rezeptor Mutationen (FHM) waren die gemittelten Gesamtcholesterinkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ($P < 0.0001$). Insgesamt beeinflusst der im SREBP-1 Gen entdeckte DNA Polymorphismus (G1028G) die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen bei

20 dieser Personengruppe nicht signifikant. In Kombination mit dem Vorhandensein der Apo B R3'500Q Mutation war der G1028G (22) Polymorphismus jedoch signifikant mit einem Anstieg der Plasmacholesterin-Konzentrationen assoziiert ($P = 0.0097$). Eine weitergehende Stratifizierung der an der

25 Studie beteiligten Personen entsprechend der zugrunde liegenden genetischen Störungen oder der klinischen Diagnose bestätigte den Effekt des neuen SREBP-2 Aminosäurepolymorphismus auf Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen bei fast allen Gruppen, aber keiner der Unterschiede erreichte statistische Signifikanz ausser bei der Patienten-

30 tengruppe mit familiärer Dysbetalipoproteinämie, FDL, und bei Personen, die an Hypercholesterinämie aufgrund unbekannter Gendefekte leiden (PHC).

35

10.2. Assoziation der A595G Mutation mit seniler Demenz vom Alzheimer Typ

Ein anderes bemerkenswertes Resultat der vorliegenden Studie ist die signifikante Differenz der Prävalenz des Wild-Typ Allels (A595A) verglichen mit der Aminosäuresubstitution (A595G), beim Vergleich eines klinisch diagnostizierten Alzheimerpatientenkollektivs mit der Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung (Tabelle 2, 2.4% versus 7.0%; $P=0.0234$).

10

10.3. Assoziation des G1028G Polymorphismus mit einem fehlenden Anstieg der Plasmalipid-Konzentration nach Gabe von Proteasehemmer bei HIV-Patienten

Die Resultate betreffend Prävalenzunterschiede sind ebenfalls in Tabelle 2 dargestellt ($P=0.0339$). Figur 4 zeigt die prozentuale Aenderung der Plasmacholesterinspiegel vor und nach Gabe von Proteasehemmern in Abhängigkeit vom G1028G Polymorphismus.

20

11. Studie umfassend den Polymorphismus in Exon 6 von SREBP-2

25

11.1. Grundlagen

Probanden

Es wurden insgesamt 1'081 Probanden aus denselben Gruppen wie bereits oben ausgeführt (711 aus der SPREAD Studie, 346 aus der IDA-Studie sowie 24 aus einem prospektiv untersuchten Kollektiv von in Basel Verstorbenen (PATH-Studie)) in diese Untersuchung aufgenommen.

30

Material

Neben den bereits beschriebenen Materialien wurde zusätzlich das Restriktionsenzym Dde I (New England Biolabs) verwendet.

35

Methoden

Die in die Studie eingeschlossenen Probanden wurden zusätzlich für eine weitere Mutation im SREBP-2-Gen (Exon 6), die zu einem Aminosäureaustausch (R371K) führt, getestet.

Die SREBP-2 R371K Mutation wurde im wesentlichen wie bereits beschrieben untersucht. Insbesondere wurde für die Lipoprotein Analysen, die DNS-Extraktionsmethode sowie für die Bestimmung des Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus (SSCP) nach der nicht-radioaktive Methode wie oben beschrieben vorgegangen.

11.2. Sequenzierung der SREBP-2, Exon 6-Mutation

Diese wurde wie bereits beschrieben durchgeführt, mit den folgenden Modifikationen: Im SREBP-2 Gen wurde die PCR-Amplifikation des Exons 6 mittels der Oligonukleotide *EcoR* I.S2.6F (Seq. Id. Nr. 17): 5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTCACTCATC-3' und *EcoR* I.S2.6R (Seq. Id. Nr. 18): 5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3' durchgeführt. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem Endvolumen von 50 µl mit 1x Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 0.4 U *Taq* Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 3.5 mM MgCl₂, 455 µM jeder der dNTP (Qiagen) und 2.0 µM jeder der beiden Oligonukleotide bei den folgenden Temperaturen ausgeführt: 94°C (45"); 56°C (30"); 72°C (1'); 32 Zyklen. Die amplifizierten Fragmente wurden mittels Subklonierung und anschliessender Sequenzierung des Inserts (wie bereits beschrieben) analysiert.

11.3. Methoden zur Identifikation der SREBP-2, Exon 6-Mutation mittels Restriktionsenzymverdauung

Zur Darstellung der SREBP-2-Mutation (Exon 6, R371K) wurden ca. 100 ng genomischer DNS mittels der be-

reits oben beschriebenen Methoden unter Verwendung der Oligonukleotide *EcoR* I.S2.6F und *EcoR* I.S2.6R amplifiziert. 20µl wurden in 1x NE Puffer mittels 7 U *Dde* I und einer Inkubationstemperatur von 37°C für 5 Stunden verdaut. Zu dem verdauten Reaktionsgemisch wurden 4µl 5x nicht-denaturierender Ladepuffer (Elchrom) dazugegeben. 7µl dieser Mischung wurden auf Spreadex Wide-Mini S-100 Gele (Elchrom) geladen, bei 55°C auf 10V/cm für 25-45 Minuten laufen gelassen, mit Ethidiumbromid gefärbt (40 Minuten), entfärbt mit destilliertem Wasser (40 Minuten), und mittels eines Gel Doc 1000 Systems digitalisiert.

11.4. Statistische Methoden

Zum Vergleich der Prävalenzen von Sequenzvariationen in den SREBP-1 und -2 Genen wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt.

11.5. Auswertung der nach obigen Angaben erhaltenen Resultate

Der Altersmedian bei den 698 Probanden der SPREAD-Studie betrug 20.5 Jahre (Altersbereich 18.8 - 43.7 Jahre), der Altersmedian bei den 370 Probanden der IDA-Studie 74.5 Jahre (Altersbereich 47.0 - 95.4 Jahre). Der Vergleich der zwei Gruppen von Probanden, die nicht selektioniert, aber unterschiedlichen Alters waren, zeigte statistisch signifikante Unterschiede im Vorhandensein von SREBP-1 und SREBP-2 Mutationen.

Die Prävalenz des Fehlens des SREBP-1c-G1028G Polymorphismus in homozygoter Form (d.h. Genotyp 11/12) bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 622/711 (87.5 %) gegenüber nurmehr 304/367 (82.8%) bei den Probanden der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von absolut -4.7% (bzw. relativ -5.4%) mit einem P-Wert von 0.038 (Chi-Quadrat Test).

Die Prävalenz des Fehlens des SREBP-2 A595G Polymorphismus in homozygoter Form (d.h. Genotyp 11/12) bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 305/711

(43.0%) gegenüber nurmehr 135/370 (36.5%) bei den Probanden der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von absolut -6.8% (bzw. relativ -15.1%) mit einem P-Wert von 0.041.

5 Die Prävalenz der SREBP-2 R371K Mutation bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 19/698 (2.7%) gegenüber nurmehr 3/370 (0.8%) bei den Probanden der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von absolut -1.9 (bzw. relativ -70.4%) mit einem P-Wert von
10 0.036.

11.6. Diskussion

Die Unterschiede in den Prävalenzen in den Gruppen von jüngeren bzw. älteren Probanden können nur
15 durch Unterschiede in der Mortalität erklärt werden, da beide Stichproben aus derselben Bevölkerung gezogen wurden.

Bei der IDA/PATH-Studienpopulation mit einem Altersmedian von 74.5 Jahren sind demnach bereits zahlreiche Probanden verstorben, die Träger des SREBP-2 G1'028G Genotyps 11/12 sind: 316 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 304 Probanden wurden mit diesem Genotyp (11/12) beobachtet, 12 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

25 Dasselbe gilt für die Träger des SREBP-2 A595G Genotyps 11/12: 159 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 135 Probanden wurden mit diesem Genotyp (11/12) beobachtet, 24 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

30 Ebenfalls gilt dies für die selteneren Träger der SREBP-2 R371K-Mutation: 10 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 3 Probanden wurden mit dieser Mutation beobachtet, 7 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

35 Eine Erklärung für die signifikant niedrigere Prävalenz bestimmter Sequenzvariationen in SREBP-1 und SREBP-2 ist die erhöhte Mortalität bei Trägern der Geno-

typen SREBP-1.18c (11/12), SREBP-2.10 (11/12) und den Trägern der SREBP-2 R371K Mutation. Dies kann beispielsweise durch die bereits beschriebene Assoziation zur Erhöhung des Plasmacholesterinspiegels mit der Folge einer koronaren Herzkrankheit bedingt sein, aber auch durch das überproportionale Auftreten von Krankheiten, wie beispielsweise der senilen Demenz vom Alzheimer Typ, wie ebenfalls bereits beschrieben, durch die beiden genannten oder durch Kombinationen mit weiteren Risikofaktoren.

Tabelle 1

Kollektiv	Studien	Beschreibung des Kollektivs	Alter	Geschlecht	Alle Individuen		Normcholesterinämische Individuen ¹⁾		Hypercholesterinämische Individuen ¹⁾	
					Mittelwert	TC Mittelwert (±1SD)	A	TC Mittelwert (±1SD)	A	TC Mittelwert (±1SD)
Alle Individuen										
TTL	SPREAD,SIBSHIP IDA,MCS,STARTER	Alle Altersgruppen	45.55	0.66	2'600	6.84 ±2.52	1'980	5.80 ±1.32	620	10.14 ±2.58
Kollektive zufällig ausgewählter Individuen										
RDM.YNG	SPREAD	Zufallsstichprobe (jung)	20.77	1.00	630	5.12 ±0.88	612	5.05 ±0.78	18	7.40 ±1.17
RDM.ELD	IDA	Zufallsstichprobe (älter)	75.98	0.67	324	6.46 ±1.49	316	6.39 ±1.45	8	8.93 ±1.01
Kollektive von Individuen mit Störungen, die primäre Hyperlipoproteinämien verursachen										
FDL	SPREAD,SIBSHIP IDA,MCS,STARTER	Apolipoprotein E Defekt (R158C, homozygot)	46.17	0.76	46	9.90 ±4.10	15	5.27 ±1.43	31	12.15 ±2.89 → FDL
FDB	SPREAD,SIBSHIP IDA,MCS,STARTER	Apolipoprotein B Defekt (R3'500Q, heterozygot)	41.49	0.54	37	9.046 ±1.341	5	6.93 ±0.86	32	9.38 ±1.08 → FDB
FHM	SIBSHIP	LDLR Defekt (molekular-genet. nachgewiesen)	34.87	0.51	74	10.93 ±2.43			74	10.93 ±2.43 → FH
PHC	SIBSHIP	Primäre, isolierte Hypercholesteriämie ²⁾	40.58	0.55	341	9.90 ±2.62	-	-	341	9.90 ±2.62
PCH	SIBSHIP	Primäre, kombinierte Hyperlipoproteinämie ²⁾	47.48	0.82	85	9.98 ±2.22	-	-	85	9.98 ±2.22 → FCH
REL	SIBSHIP	Verwandte, nicht betroffen ³⁾	40.19	0.54	318	6.39 ±1.19	310	6.35 ±1.17	8	8.11 ±0.34

Kollektive von Individuen mit Störungen, die sekundäre Hyperlipoproteinämien verursachen⁴

DIA	STARTER, SIBSHIP IDA, MCS	Diabetes mellitus (GlucosePlasma > 7.8 mmol/L)	50.96	0.59	229	6.48	±1.97	191	5.87	±1.21	38	9.55 → SHL	±2.20
RIN	STARTER, SIBSHIP IDA, MCS	Niereninsuffizienz (Klärung < 50 ml/min.))	76.63	0.44	131	7.17	±2.68	115	6.83	±2.58	16	9.65 → SHL	±2.07
LIV	STARTER, SIBSHIP IDA, MCS	Alkoholkonsum > 60 g/T und/oder γ -GT > 664/l	53.32	0.85	151	8.22	±2.89	86	6.49	±1.25	65	10.52 → SHL	±2.84
HTH	STARTER, SIBSHIP IDA, MCS	Schilddrüsenunterfunktion (TSH > 4.0 mIU/L)	59.53	0.15	102	6.54	±1.97	86	5.92	±1.02	16	9.86 → SHL	±2.49

Kollektive von Individuen mit Störungen, die möglicherweise mit SREBP-1 und/oder -2 in Zusammenhang stehen

MEM.TTL	MCS	Erwachsene (alle Altersgruppen)	70.63	0.46	413	6.24	±1.67	387	6.09	±1.61	26	8.39	±0.93
MEM.DAT		Demenz vom Alzheimer Typ (MMS < 26)	73.50	41.2	165	6.16	±1.31	157	6.06	±1.25	8	8.17	±0.61
HIV.STB	STARTER	TC, nicht ansteigend unter Proteaseinhibitoren ⁵⁾	34.24	80.0	25	4.79	±1.31	24	4.70	±1.25	1	7.05	
HIV.INC		TC, ansteigend unter Protease Inhibitoren ⁵⁾	38.06	85.0	20	4.52	±0.91	20	4.52	±0.91			

¹⁾ Normcholesterinämisch: Plasmacholesterin < 90er Perzentile, entsprechend Alter und Geschlecht; hypercholesterinämisch: Plasmacholesterin > 90er Perzentile, entsprechend Alter und Geschlecht

²⁾ Zugrunde liegende molekulare Defekte unbekannt

³⁾ Nur unverwandte Individuen (eine nicht betroffene Person pro Familie und alle Ehegatten, Schwäger und Schwägerinnen genetisch unverwandt)

⁴⁾ Kombinierte Kollektive aus Individuen, die aufgrund von sekundären Hyperlipoproteinämien ausgewählt wurden, und Individuen aus anderen Kollektiven

⁵⁾ HIV positive Individuen, bei denen die Plasmagesamtkonzentrationen nicht (STB) oder nach Verabreichung von Proteaseinhibitoren ansteigen (INC)

Tabelle 2

Kollektiv	SREBP-1 Polymorphismus (G1028G)					SREBP-2 Polymorphismus (A595G)				
	11	12	22	P	P $\Delta\text{TC}^{(5)}$	11	12	22	P	P $\Delta\text{TC}^{(6)}$
Prävalenz ⁽¹⁾ TC Mittelwert ⁽²⁾										
Alle Individuen										
TTL	PR 40.35 (1'049)	45.62 (1'186)	14.04 (365)	-	-	6.69 (174)	35.15 (914)	58.15 (1'512)	-	-
TC	6.74 ± 2.47	6.88 ± 2.53	6.99 ± 2.61	0.2309		7.47 ± 3.48	6.83 ± 2.57	6.77 ± 2.34	0.0005	
Kollektive zufällig ausgewählter Individuen										
RDM.YNG	PR 41.75 (263)	45.71 (288)	12.54 (79)	0.3270	5.87 (37)	36.51 (230)	57.62 (363)		0.3445	
TC	5.04 ± 0.87	5.15 ± 0.90	5.24 ± 0.87	0.1735	5.15 ± 0.85	5.06 ± 0.91	5.15 ± 0.87	0.7943		
RDM.ELD	PR 41.36 (134)	40.74 (132)	17.90 (58)	0.0324	5.56 (18)	30.25 (98)	64.20 (208)		0.3815	
TC	6.50 ± 1.55	6.41 ± 1.41	6.36 ± 1.53	0.5796	6.77 ± 1.51	6.55 ± 1.66	6.39 ± 1.40	0.3525		
Kollektive von Individuen mit Störungen, die primäre Hyperlipoproteinämien verursachen										
FDL	PR 32.26 (10)	41.94 (13)	25.81 (8)	0.0578	9.68 (3)	16.13 (5)	74.19 (23)		0.5034	
TC	12.63 ± 2.78	11.54 ± 3.37	12.96 ± 2.15	0.4351	16.89 ± 3.45	10.62 ± 1.76	12.01 ± 2.47	0.0020		
FDB	PR 33.33 (12)	38.89 (14)	16.67 (6)	0.4401	8.33 (3)	44.44 (16)	36.11 (13)		0.5412	
TC	9.99 ± 0.98	9.06 ± 1.12	8.92 ± 0.68	0.2393	8.63 ± 0.22	9.21 ± 1.09	9.77 ± 1.01	0.1989		
FHM	PR 33.78 (25)	48.65 (36)	17.57 (13)	0.3753	8.11 (6)	35.14 (26)	56.76 (42)		0.6210	
TC	11.55 ± 1.98	10.56 ± 2.09	10.74 ± 3.58	0.7579	11.15 ± 2.34	11.06 ± 2.13	10.81 ± 2.59	0.8118		
PHC	PR 38.12 (130)	48.09 (164)	13.78 (47)	0.8842	9.38 (32)	37.24 (127)	53.37 (182)		0.0328	
TC	9.74 ± 2.31	10.04 ± 2.97	9.85 ± 2.06	0.8737	10.89 ± 4.82	9.90 ± 2.20	9.72 ± 2.31	0.0240		
PCH	PR 41.18 (35)	43.53 (37)	15.29 (13)	0.7347	10.59 (9)	36.47 (31)	52.94 (45)		0.1439	
TC	9.97 ± 2.46	9.81 ± 1.82	10.50 ± 2.69	0.3650	9.71 ± 2.23	10.35 ± 2.98	9.78 ± 1.53	0.7019		
REL	PR 39.62 (126)	46.86 (149)	13.52 (43)	0.7772	6.60 (21)	33.33 (106)	60.06 (191)		0.9462	
TC	6.38 ± 1.16	6.44 ± 1.09	6.27 ± 1.55	0.4679	6.43 ± 1.10	6.33 ± 1.26	6.42 ± 1.16	0.8984		

Kollektiv	SREBP-1 Polymorphismus (G1028G)					SREBP-2 Polymorphismus (A595G)				
	11	12	22	P	ΔPR^3	11	12	22	P	ΔPR^4
Prävalenz ¹⁾ TC Mittelwert ²⁾					ΔTC^5					ΔTC^6
Kollektive von Individuen mit Störungen, die sekundäre Hyperlipoproteidämien verursachen										
DIA	PR 39.30 TC 6.47	43.67 (90) ±1.78	17.03 (39) 6.62 ±2.57	0.1723 0.6233		6.55 (15) 6.48 ±1.69	38.86 (89) 6.47 ±1.92	54.59 (125) 6.49 ±2.05		0.9282 0.9985
RIN	PR 40.46 TC 7.27	45.80 (53) ±3.37	13.74 (18) 6.96 ±2.49	0.9197 0.7193		6.11 (8) 7.44 ±2.04	40.46 (53) 7.14 ±3.42	53.44 (70) 7.16 ±2.07		0.7832 0.7692
LIV	PR 38.51 TC 8.14	47.30 (57) ±2.55	14.19 (21) 7.92 ±2.11	0.9567 0.6011		8.11 (12) 9.81 ±4.78	32.43 (48) 8.02 ±3.06	61.49 (91) 8.25 ±2.43		0.5249 0.0696
HTH	PR 37.63 TC 6.17	46.24 (35) ±1.80	16.13 (15) 6.00 ±1.29	0.5545 0.2678		6.45 (6) 7.46 ±1.56	24.73 (23) 7.09 ±2.78	68.82 (64) 6.00 ±1.11		0.9246 0.1174
Kollektive von Individuen mit Störungen, die möglicherweise mit SREBP-1 und/oder -2 in Zusammenhang stehen										
TTL - DAT	PR 40.16 TC 6.78	45.59 (978) ±2.53	14.25 (347) 7.05 ±2.63	0.2225		6.98 (170) 7.48 ±3.52	34.99 (852) 6.88 ±2.63	58.03 (1'413) 6.81 ±2.39		0.0018
DAT	PR 43.03 TC 6.14	46.06 (71) ±1.22	10.91 (18) 5.92 ±1.78	0.2318 0.4050		2.42 (4) 7.44 ±1.19	37.58 (62) 6.14 ±1.34	60.00 (99) 6.12 ±1.28		0.0234 0.0487
HIV.STB	PR 52.00 TC 4.85	28.00 (13) ±1.53	20.00 (5) 5.37 ±1.37	0.2772		16.00 (4) 3.99 ±0.62	36.00 (9) 4.77 ±1.47	48.00 (12) 5.08 ±1.32		0.1855
HIV.INC	PR 40.00 TC 4.26	60.00 (8) ±1.03	0.00 (0) 4.70 ±0.82	-		5.00 (1) 2.13 -	45.00 (9) 4.80 ±0.26	50.00 (10) 4.51 ±0.98		0.2433 0.0036

¹⁾ Prävalenz (=PR) in Prozent, (Anzahl der Individuen)

²⁾ Mittelwert der Plasmagesamtscholesterinkonzentrationen (=TC) in mmol/L, (±SD)

³⁾ ΔPR = PR11/12 vs. PR22; Signifikanzhöhe (P) des Unterschieds zwischen der Prävalenz des Kollektivs (PR.Kollektiv) vs. Prävalenz aller Individuen (PR.TTL) minus Prävalenz des entsprechenden Kollektivs (PR.Kollektiv): (P von PR.Kollektiv vs. (PR.TTL - PR.Kollektiv))

⁴⁾ ΔPR = PR11 vs. PR12/22; Signifikanzhöhe (P) des Unterschieds zwischen der Prävalenz des Kollektivs (PR.Kollektiv) vs. Prävalenz aller Individuen (PR.TTL) minus Prävalenz des entsprechenden Kollektivs (PR.Kollektiv): (P von PR.Kollektiv vs. (PR.TTL - PR.Kollektiv))

⁵⁾ ΔTC = TC11/12 vs. TC22 / ⁶⁾ ΔTC = TC11 vs. TC12/22

Literaturangaben:

(Literatur wird im Text direkt zitiert oder aber es wird
5 auf die unten angeführten Dokumente durch Nennung der
entsprechenden Zitatnummer (in Klammer) verwiesen)

1. Miller, S. A. 1988. A simple salting out
10 procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res. 16:1215.
2. Miserez, A. R., R. Laager, N. Chiodetti,
und U. Keller. 1994. High prevalence of familial defecti-
ve apolipoprotein B-100 in Switzerland. *J. Lipid Res.*
15 35:574-583.
3. Hobbs, H. H., M. S. Brown, und J. L. Gold-
stein. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene
in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 1:445-466.
4. Sambrook, J., E. F. Fritsch, und T. Mania-
20 tis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold
Spring Harbor Laboratory Press*. Second Edition.:
5. Hixson, J. E. und D. T. Vernier. 1990. Re-
striction isotyping of human apolipoprotein E by gene am-
plification and cleavage with Hha I. *J. Lipid Res.*
25 31:545-548.
6. Ruzicka, V., W. März, A. Russ, und W.
Gross. 1992. Apolipoprotein B(Arg3500 to Gln) allele spe-
cific polymerase chain reaction: large-scale screening of
pooled blood samples. *J. Lipid Res.* 33:1563-1567.
7. Schuster, H., G. Rauh, S. Müller, C. Kel-
30 ler, G. Wolfram, und N. Zöllner. 1992. Allele-specific
and asymmetric polymerase chain reaction amplification in
combination: a one step polymerase chain reaction proto-
col for rapid diagnosis of familial defective apolipopro-
35 tein B-100. *Anal. Biochem.* 204:22-25.

8. Hansen, P. S., N. Rüdiger, A. Tybjaerg-Hansen, O. Faergeman, and N. Gregersen. 1991. Detection of the apoB-3500 mutation (glutamine for arginine) by gene amplification and cleavage with MspI. *J. Lipid Res.* 32:1229-1233.
9. Miserez, A. R., H. Schuster, N. Chiodetti, und U. Keller. 1993. Polymorphic Haplotypes and recombination rates at the LDL receptor gene locus in subjects with and without familial hypercholesterolemia who are from different populations. *Am. J. Hum. Genet.* 52:808-826.
10. Miserez, A. R. und U. Keller. 1995. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:1719-1729.
11. Hua, X., J. Sakai, Y. K. Ho, J. L. Goldstein, und M. S. Brown. 1995. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J. Biol. Chem.* 270:29422-29427.
12. Hua, X., C. Yokoyama, J. Wu, M. R. Briggs, M. S. Brown, J. L. Goldstein, und X. Wang. 1993. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11603-11607.
13. Oberhänsli, I., D. Pometta, H. Micheli, L. Raymond, und A. Suenram. 1982. Lipid, lipoprotein and apo-A and apo-B lipoprotein distribution in Italian and Swiss schoolchildren. The Geneva Survey. *Pediatr. Res.* 16:665-669.
14. Burnand, B., V. Wietlisbach, W. Riesen, G. Nosedà, M. Barazzoni, M. Rickenbach, und F. Gutzwiller. 1993. Lipides sanguins dans la population suisse:

enquête MONICA 1988-89. *Schweiz. Med. Wschr.*
123 (Suppl.48):29-37.

15. Tontonoz, P., J. B. Kim, R. A. Graves,
und B. M. Spiegelman. 1993. ADD1: a novel helix-loop-helix
5 transcription factor associated with adipocyte determina-
tion and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 13:4753-4759.

16. Yokoyama, C., X. Wang, M. R. Briggs, A.
Admon, J. Wu, X. Hua, und J. L. Goldstein. 1993. SREBP-1,
a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that con-
10 trols transcription of the low density lipoprotein recep-
tor gene. *Cell* 75:187-197.

17. Kan, H. Y., P. Pissios, J. Chambaz, und
V. I. Zannis. 1999. DNA binding specificity and transac-
tivation properties of SREBP-2 bound to multiple sites on
15 the human apoA-II promoter. *Nucleic Acids Res.*
27(4):1104-1117.

18. Sakai, J., A. Nohturfft, J. L. Goldstein,
und M. S. Brown. 1998. Cleavage of Sterol Regulatory Ele-
ment-binding Proteins (SREBPs) at Site-1 Requires Inter-
20 action with SREBP Cleavage-activating Protein. (Evidence
from *in vivo* competition studies). *J. Biol. Chem.*
273(10):5785-5793.

19. Brown, M. S. und J. L. Goldstein. 1997.
The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism
25 by Proteolysis of a membrane-bound transcription factor.
Cell 89:331-340.

20. Hua, X., J. Wu, J.L. Goldstein, M.S.
Brown, und H.H. Hobbs. 1995. Structure of the human gene
encoding sterol regulatory element binding protein-1
30 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromo-
somes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25:667-673.

21. Miserez, A.R., G. Cao, L. C. Probst, und
H.H. Hobbs. 1997. Structure of the human gene encoding
sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Ge-
35 nomics* 40:31-40.

Ansprüche

1. Verfahren zur Erkennung eines erhöhten oder erniedrigten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos und/oder einer erhöhten oder erniedrigten Sensitivität auf Therapieverfahren resp. deren Nebenwirkungen, dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme, das Blut resp. Gewebe auf das Vorhandensein eines Polymorphismus in mindestens einem Sterol-Regulator Element-Bindenden-Protein (SREBP) untersucht wird, wobei das Vorhandensein eines Polymorphismus auf Amino- und/oder Nukleinsäure-Ebene bestimmt wird.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das SREBP ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend SREBP-1 und SREBP-2.

3. Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus zu einer erhöhten oder erniedrigten Aktivierung von Genen im Lipidstoffwechsel, insbesondere im Cholesterinstoffwechsel führt.

4. Verfahren gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus zu erhöhter oder erniedrigter Plasmakonzentration mindestens eines Lipids, insbesondere von Cholesterin, führt.

5. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Vorhandenseins eines Polymorphismus auf Nukleinsäure-Ebene erfolgt.

6. Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus eine Erkennungssequenz für eine innerhalb des Polymorphismus liegende Schnittstelle aufweist und dass die Untersuchung unter Verwendung dieser Erkennungssequenz erfolgt.

7. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungssequenz eine Erkennungssequenz für XmnI oder MspI ist, d.h. GAANNNTTC oder CCGG, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann.

8. Verfahren gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung unter Verwendung einer SREBP-Sequenz oder einer SREBP-Teilsequenz erfolgt, die eine Nukleinsäure-Sequenz ausgewählt aus der Gruppe
5 der nachfolgend aufgeführten Sequenzen, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuren aus der natürlichen Nachbarschaft der entsprechenden Sequenz, umfasst:

SREBP-1, Exon 18c (Seq. Id. Nr. 3):

GCACCTAGGGAAAGGCTTC

10 SREBP-2, Exon 10 (Seq. Id. Nr. 7):

CTGCTGCCGGCAACCTACA

9. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung unter Verwendung einer SREBP-Sequenz oder einer SREBP-Teilsequenz erfolgt,
15 die die folgende Nukleinsäure-Sequenz, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuren aus der natürlichen Nachbarschaft dieser Sequenz, umfasst:

SREBP-2, Exon 6: CTGAAGAAG

10. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1
20 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Vorhandenseins eines Polymorphismus auf Aminosäure-Ebene erfolgt.

11. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1
bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Ge-
25 webeentnahme und DNA-Extraktion mindestens ein Teilstück eines Exons eines SREBP, das einen Polymorphismus enthält, unter Verwendung zweier Oligonukleotidsequenzen amplifiziert wird, wobei der Polymorphismus charakteristisch ist für eine erhöhte oder erniedrigte Aktivierung
30 von Genen im Lipidstoffwechsel insbesondere im Cholesterinstoffwechsel, und dass das Produkt der Amplifikation einer Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder einer Denaturierung unterworfen wird und dass die Verdauungs- resp. Denaturierungsprodukte elektrophore-
35 tisch aufgetrennt werden.

12. Verfahren gemäss Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus charakteri-

stisch ist für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholesterinämie beim Menschen.

13. Verfahren gemäss Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der Oligonukleotidsequenzen im Intronbereich angesiedelt ist, der dem Exon benachbart ist, in dem der Polymorphismus existiert.

14. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenzen ausgewählt sind aus den folgenden Paaren oder damit unter stringenten Bedingungen hybridisierenden Sequenzen:

S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9):

5'-TTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' und

15 **S1.18cR** (Seq. Id. Nr. 10):

5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

EcoR I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11):

5'-CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' und

EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12):

20 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13):

5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und

S2.10P.R. (Seq. Id. Nr. 14):

5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' oder

25 **EcoRI S2.10F** (Seq. Id. Nr. 15):

5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und

EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16):

5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3'

EcoRI S2.6F (Seq. Id. Nr. 17):

30 5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTCACTCATC-3'

EcoRI S2.6R (Seq. Id. Nr. 18):

5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3'.

15. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus ermittelt worden ist durch amplifizieren und analysieren einer interessierenden SREBP-Sequenz, Vergleich der Exon-Bereiche dieser interessierenden Sequenz mit den Exon-

Bereichen der Sequenz des in einer Population am häufigsten auftretenden Typs des entsprechenden SREBP und Untersuchung der Sequenzen mit gefundenen Unterschieden auf Fehlfunktion.

5 16. Verfahren gemäss Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterschiede zu einer anderen Aminosäure und/oder insbesondere zu einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym führen.

10 17. Verwendung des Verfahrens gemäss einem der Ansprüche 11 bis 16, zur Bestimmung des erhöhten oder erniedrigten Risikos für Hypercholesterinämie und/oder Alzheimer Krankheit.

15 18. Verwendung des Verfahrens gemäss einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Bestimmung eines erhöhten oder erniedrigten Risikos für das Auftreten von Nebenwirkungen bei der HIV-Therapie, insbesondere der Therapie mit Proteasehemmern.

20 19. Verwendung des Verfahrens gemäss einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Bestimmung eines erhöhten oder erniedrigten Mortalitätsrisikos.

20. DNA- und/oder RNA-Chip, dadurch gekennzeichnet, dass er mindestens einen Polymorphismus auf einem SREBP, insbesondere SREBP-1 und/oder SREBP-2, aufweist.

25 21. DNA- und/oder RNA-Chip gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus ein Polymorphismus auf SREBP-1 und/oder SREBP-2 wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert, ist.

30 22. DNA- oder RNA-Chip gemäss Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass er den SREBP Polymorphismus in Gegenwart anderer Polymorphismen, die für die Abschätzung des Risikos für Hypercholesterinämie und/oder Alzheimer-Krankheit charakteristisch sind, aufweist.

35 23. Verwendung eines Polymorphismus wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 als Marker zur

Bestimmung eines erhöhten oder verminderten Risikos für den Ausbruch einer Krankheit.

24. Verwendung gemäss Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus Hypercholesterinämie und Alzheimer-Krankheit.

25. Verwendung eines Polymorphismus wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Bestimmung eines erhöhten oder erniedrigten Risikos für das Auftreten von Nebenwirkungen bei der HIV-Therapie, insbesondere der Therapie mit Proteasehemmern.

26. Verwendung eines Polymorphismus wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Bestimmung eines erhöhten oder verminderten Mortalitätsrisikos.

27. Verwendung eines Polymorphismus, wie in einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Prüfung der Eignung einer Behandlungsmethode für eine Krankheit ausgewählt aus der Gruppe umfassend Hypercholesterinämie, Alzheimer-Krankheit und HIV, oder für das Wirkstoffscreening.

28. Polymorphismus, der charakteristisch ist für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholesterinämie beim Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass er in einem Sterol-Regulator Element-Bindenden-Protein (SREBP) auftritt.

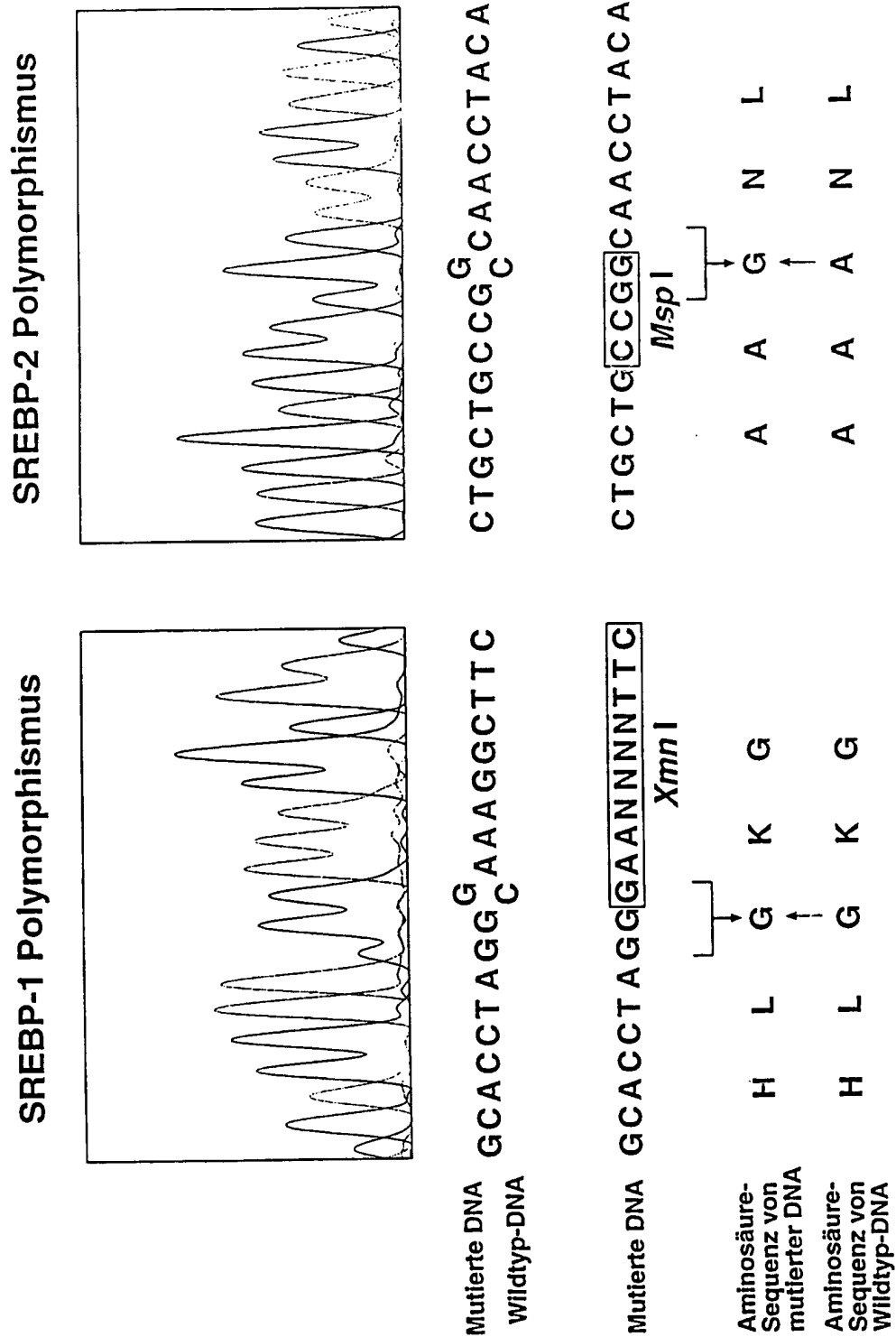
29. Polymorphismus gemäss Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass er im SREBP-1 oder SREBP-2 auftritt.

30. Polymorphismus gemäss Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass er eine Erkennungssequenz für XmnI oder MspI aufweist, d.h. GAANNNTTC oder CCGG, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann.

31. Polymorphismus gemäss Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass er die folgenden Sequenzen aufweist:

SREBP-1, Exon 18c (Seq. Id. Nr. 1):
GCACCTAGGGAAAGGCTTC
SREBP-2, Exon 10 (Seq. Id. Nr. 5):
CTGCTGCCGGCAACCTACA.

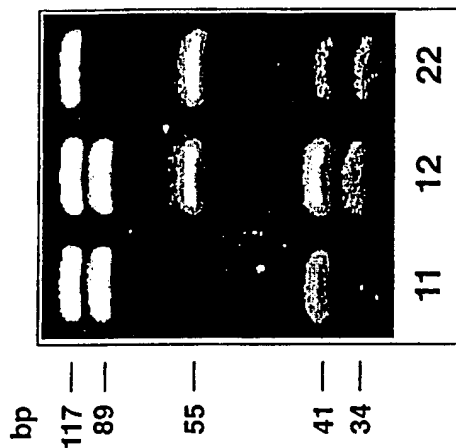
1/4



Figur 1A

Figur 1B

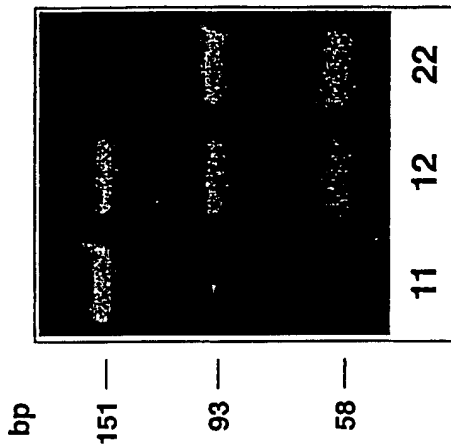
SREBP-2 Polymorphism



Intron 9 Exon 10

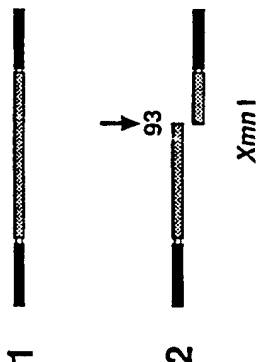
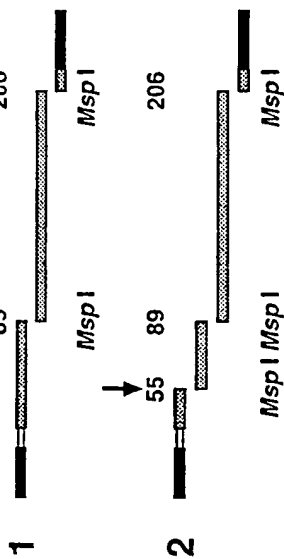
S2.10P.F S2.10P.R

SREBP-1 Polymorphism



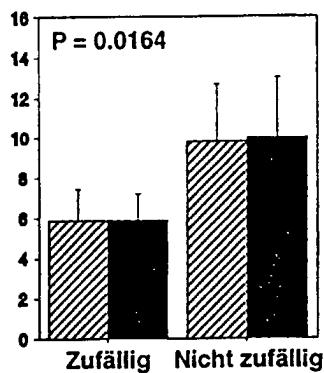
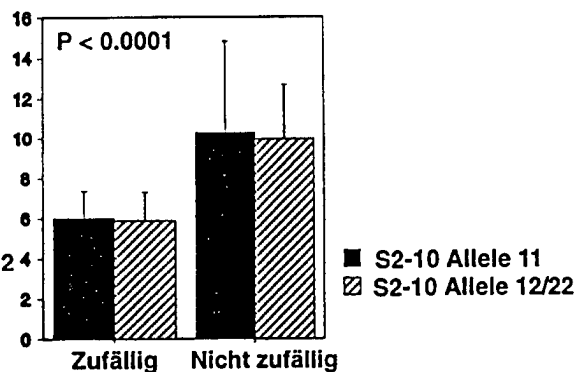
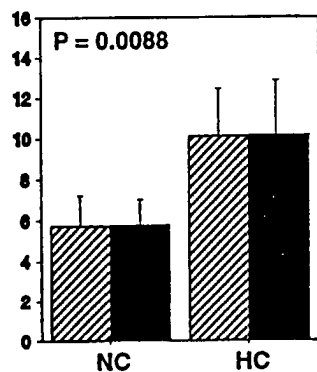
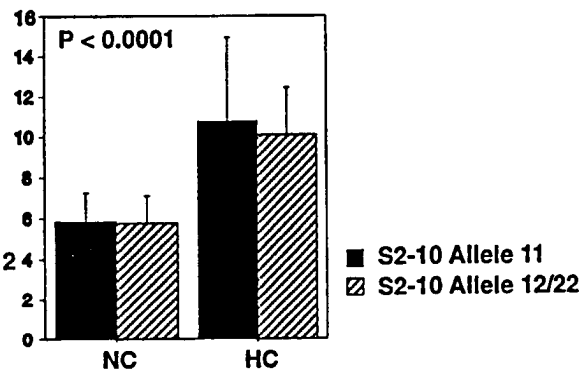
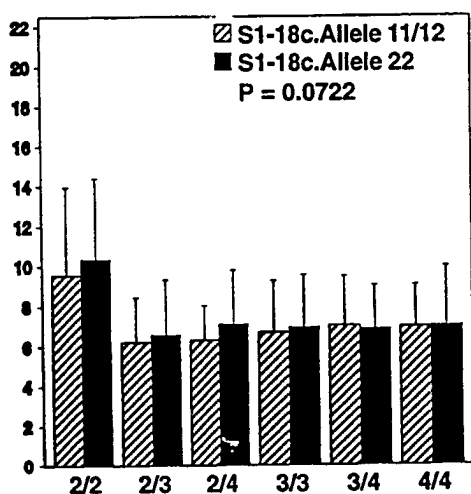
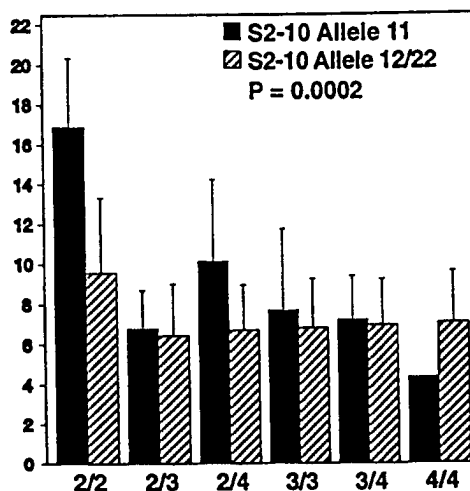
Intron 19a Exon 18c

S1.18c.F S1.18c.R

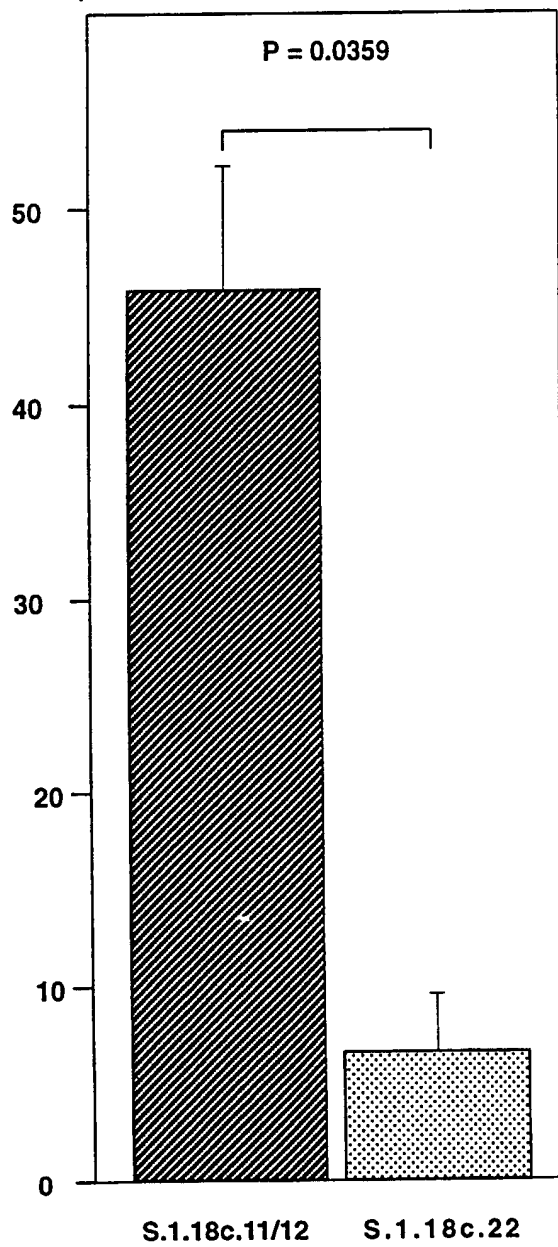


Figur 2A

Figur 2B

SREBP-1 Polymorphismus
(mmol/L)**A****SREBP-2 Polymorphismus**
(mmol/L)**B****C****D****E****F****Figur 3**

**Änderung der
Gesamtcholesterinkonzentration
nach Proteaseinhibitorbehandlung
(in Prozent)**



Figur 4

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Miserez, André R.

<120> DNA-Polymorphismen in Stero-Regulator Element-Bindenden
Proteinen

<130> Seq. Listing zu 02280PC

<140>

<141>

<150> CH 1277/99

<151> 1999-07-09

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(19)

<400> 1

g cac cta ggc aaa ggc ttc

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

19

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(19)

<400> 3

g cac cta ggg aaa ggc ttc

19

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctgctgccgc caacctaca

19

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ala Ala Ala Asn Leu Gln

1

5

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ctgctgccgg caacctaca

19

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ala Ala Gly Asn Leu Gln

1

5

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 9

ttattaataa tctgggtttt gtgtc

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 10

gggaagagct aagttaaaag ttgtg

25

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 11

cggaattctg aaattattta taatctgggt tttgtgtc

38

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 12

cggaattcat cggggaagag ctaagttaaa agttgtg

37

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 13

gccagtgacc attaacacct tttga

25

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 14

tcgtcttcaa agcctgcctc agtggctggc

30

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 15

cggaattcgc cagtgaccat taacaccttt tga

33

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 16

cggaattctg cagcaagcca gtcacagca gct

33

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 17
cggaattctg gtctcactgt gttttcactc atc 33

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 18
cggaattcgc cagggtgac aagccttttc tca 33

<210> 19
<211> 46
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 19
gccagaggag attttgcagc tgctgccggc aacctacaaa cctgcc 46

<210> 20
<211> 46
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 20
ggcaggtttg taggttgccg gcagcagctg caaaatctcc tctggc 46